

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 35 553.3

Anmeldetag: 30. Juli 1999

Anmelder/Inhaber: Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg/DE

Bezeichnung: Kombinatorische Peptidsynthese mit Hilfe eines
Laserdruckers

IPC: C 07 K 17/12

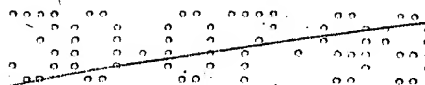
Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 25. Oktober 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

Kahle

BEST AVAILABLE COPY



Kombinatorische Peptidsynthese mithilfe eines Laserdruckers

Das Prinzip der kombinatorischen Synthese

Ziel der vorgestellten Methode ist die kombinatorische Synthese eines Arrays von möglichst vielen, möglichst dicht gepackten Peptiden auf einem Träger. Das Prinzip der kombinatorischen Synthese wird in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Allen Verfahren der kombinatorischen Synthese ist dabei gemeinsam, daß mithilfe einer kleinen Zahl von unterschiedlichen Monomeren eine prinzipiell nahezu unbegrenzte Zahl von unterschiedlichen Oligomeren (= eine Molekülbibliothek) synthetisiert werden kann. Dies geschieht durch einen repetitiven Prozeß bei dem:

1. Monomere auf den Träger aufgebracht werden
2. die unterschiedlichen Monomere an den Träger gekoppelt werden (diese besitzen eine Schutzgruppe, damit nicht mehrere Moleküle hintereinander gekoppelt werden)
3. die nicht gekoppelten Monomere gewaschen werden
4. die Schutzgruppen abgespalten werden und
5. der nächste Zyklus beginnt mit dem erneuten aufbringen der Monomere auf den Träger

Je nach Anzahl der verschiedenen Monomere ergibt die kombinatorische Synthese dabei schon bei rel. kurzen Oligomeren eine astronomische Zahl der möglichen Kombinationen. Wenn beispielsweise Peptide durch die kombinatorische Kopplung von Aminosäuren hergestellt werden sollen, so gibt es $20^2 = 400$ verschiedene Dipeptide, $20^4 = 160.000$ verschiedene Tetrapeptide oder $20^6 = 64.000.000$ verschiedene Hexapeptide (Abbildung 4). Damit bestimmt die Packungsdichte letztendlich die Komplexität der synthetisierbaren Moleküle.

Was & Warum?

Damit kann man beispielsweise sämtliche menschlichen Genprodukte als Array von überlappenden Peptiden auf einen solchen Filter bringen (Abbildung 23). Synthetisiert man 15mere, die mit den Nachbarpeptiden um jeweils 10 Aminosäuren überlappen, so braucht man dafür ca 10 Millionen Peptide. Verwenden kann man diese Arrays dann z.B. für das erstellen von Epitopprofilen (Abbildung 23x):

1. von monoklonalen Antikörpern
2. von Seren von Patienten
 - a. von Autoimmunpatienten
 - b. von Krankheiten, die im Verdacht stehen eine Autoimmunkomponente zu haben
 - c. von Krebspatienten
 - d. aber vielleicht auch von anderen Krankheiten wie Herzinfarkt, Schlaganfall=> die haben ja vielleicht auch einen autologen Titer gegen körpereigene Proteine
3. Eine weitere Möglichkeit, ist die Suche nach Interaktionspartnern
 - a. menschlicher Proteine untereinander
 - b. oder mit Genprodukten von Krankheitserregern, z.B. mit viralen Genprodukten
 - c. mit defekten Genprodukten verglichen mit intakten Genprodukten



Technische Kennzahlen der Methode

- Vergleich mit anderen Methoden**
- Änderungen / Verbesserungen in der Zukunft**

Technische Kennzahlen

Der bei den folgenden Versuchen verwendete Laserdrucker hat eine Auflösung der gedruckten Punkte von 600dpi (dots per inch). Das entspricht einem Durchmesser der aufgedruckten einzelnen Pixel von ca 40µm, bzw. ein solcher Laserdrucker setzt bei jedem normalen Druckvorgang pro DinA4 Seite (ca 20 x 30 cm) etwa 4500 x 7000 Punkte. Dies wiederum entspricht etwa 30 Millionen Punkte pro DinA4 Seite (Abbildung 14).

Abbildung 10b zeigt, daß diese hohe Auflösung bei einem normalen Druckvorgang nahezu fehlerfrei und reproduzierbar "geerntet" werden kann. Tatsächlich zeigt auch die stärkste Vergrößerung von Abbildung 10b keinen einzigen falsch gesetzten Pixel.

Damit müßten ca 5 Millionen dunkler Spots auf einer DinA4-Seite separat voneinander untergebracht werden können, wenn jeweils ein Pixel drumrum freigelassen wird. Dies ist aber sicherlich noch lange nicht der Endpunkt einer offensichtlich rasanten technologischen Entwicklung. Die bereits jetzt schon käuflich erwerbbar Laserdrucker mit einer Auflösung von 2.400dpi setzen etwa 500 Millionen Bildpunkte pro DinA4 Seite, womit ca 80 Millionen dunkler Spots auf einer DinA4-Seite separat voneinander untergebracht werden können.

Auch das Auslesen der Bildpunkte ist kein allzu großes Problem, da bereits jetzt handelsübliche, billige und schnelle Scanner zur Verfügung stehen, die eine Auflösung von 4800dpi oder besser erreichen.

Alle diese Geräte werden in den kommenden Jahren sicherlich kontinuierlich verbessert werden, wobei die zu erwartende Grenze der Auflösung im Bereich einer Lichtwellenlänge liegen wird. Mit der Entwicklungswelle, die zu hochauflösenden Laserdruckern und Scannern führt, surft auch die vorgestellte Methode mit, sodaß in den nächsten Jahren eine kontinuierlich verbesserte Packungsdichte der synthetisierbaren Molekülbibliotheken zu erwarten ist.

Stand der Forschung

Vergleich mit anderen gebräuchlichen Verfahren für die kombinatorische Synthese

1. Vergleich mit den lithographischen Synthesen

In den nächsten Abbildungen sind einige gebräuchliche Verfahren für die kombinatorische Synthese schematisch dargestellt. Für die lithographischen Syntheseverfahren steht dabei insbesondere der Name der Firma Affymetrix. Sie sind in Abbildung 19A und 19B dargestellt. Bei diesen Verfahren wird aufgrund der Einwirkung von Licht der Syntheseort für die aktivierten Monomere zugänglich gemacht (Abbildung 19A), oder aber es werden lichtempfindliche Schutzgruppen abgespalten (Abbildung 19B), wodurch eine lokal definierbare Kettenverlängerung ermöglicht wird.

Die zwei lithographischen Verfahren (Abbildung 19A & 19B) erreichen zwar eine bisher konkurrenzlose Auflösung der einzelnen Punkte, schaffen aber offensichtlich nicht die Effizienzen und die Qualität der bewährten Standardsynthesen für Oligonukleotide oder gar für Peptide.



Die erste Publikation von Affymetrix beschäftigte sich übrigens mit der Peptidsynthese und da ist bisher sehr wenig nachgekommen. Die allermeisten Folgepublikationen hatten die Oligonukleotidsynthese zum Thema.

Zum kleinen Teil mag das an der etwas anderen Chemie liegen, die der Einsatz von Licht labilen Schutzgruppen mit sich bringt. Diese Chemie ist sicherlich noch nicht so optimiert worden ist wie die Standard fmoc Chemie.

Es gibt dafür jedoch noch einen wichtigeren prinzipiellen Grund, der in Abbildung 21 schematisch dargestellt wird. Bei allen Druckverfahren wird immer eine ganze Schicht von unterschiedlichen Monomeren auf den Träger aufgebracht, die dann alle zusammen einen Kopplungszyklus durchlaufen bevor wiederum die nächste Schicht von Monomeren aufgedruckt wird. Bei den in Abbildung 19A & 19B dargestellten lithographischen Syntheseverfahren dagegen muß jede Art von Monomer nacheinander einzeln aufgebracht, gekoppelt und überschüssige Monomere gewaschen werden. Dies bedeutet, daß für die Synthese desselben Arrays von Oligomeren, die lithographischen Synthesemethoden $N \times$ mehr Kopplungszyklen durchlaufen müssen als bei den Druckverfahren nötig (Abbildung 19C & 19D). Die Zahl N steht dabei für die Anzahl unterschiedlicher Monomere, d.h. für die Synthese eines Arrays von Oligopeptiden brauchen die lithographischen Synthesen 20x mehr Kopplungszyklen verglichen mit den Druckverfahren. Dadurch wird die Fehlerrate bei der Synthese natürlich enorm erhöht, bzw. die Qualität des Endproduktes wird verschlechtert.

Die momentane Standardtechnik der Peptidsynthese erlaubt dabei mehr schlecht als recht die Synthese von Peptiden mit 100 Aminosäuren Länge, was bedeutet, daß die dargestellten lithographischen Syntheseverfahren schon bei der Synthese eines Arrays von Pentapeptiden sehr große Qualitätsprobleme haben. Dies ist wahrscheinlich der Grund, warum die lithographischen Verfahren bisher nur für die Synthese von Oligonukleotidarrays verwendet wurden, da dabei nur 4 verschiedene Monomere an den Träger gekoppelt werden müssen.

Ein weiterer Nebeneffekt ist die vergleichsweise schlechte Chemikalienausbeute der lithographischen Methoden, da für jede einzelne Kopplungsreaktion der gesamte Träger gleichmäßig mit den reaktiven Monomeren bedeckt werden muß.

Übrigends haben die bisher verwendeten lithographischen Methoden ein weiteres Problem, da sie das Prinzip des konfokalen Lasermikroskops zum Auslesen ihrer Signale verwenden. Damit müssen sie alle drei Dimensionen absuchen, um das gewünschte Signal zu finden, was sehr langsam ist verglichen beispielsweise mit einem Scanner (Abbildung 22). Deswegen macht die langsame Auslesegeschwindigkeit diesen Systemen ab einer bestimmten Komplexitätsstufe zu schaffen.

2. Vergleich mit anderen Druckverfahren

In Abbildung 19C und 19D werden zwei Druckverfahren für die kombinatorische Synthese einander gegenübergestellt. Das in Abbildung 19C schematisch dargestellte Verfahren entspricht dabei dem hier neu vorgestellten Verfahren, während das in Abbildung 19D dargestellte Verfahren die diversen gebräuchlichen Druckverfahren mit Druckflüssigkeiten repräsentiert (Spotten, Tintenstrahldrucker, Siebdruck etc.).

Die folgenden Abschnitte diskutieren die Vorteile, die der Einsatz eines Laserdruckers bei der Peptidsynthese gegenüber den anderen gebräuchlichen Verfahren bringt.

Kombinatorische Synthesen, bei denen die einzelnen Monomere über und nebeneinander gespottet, oder gar mit einem Tintenstrahldrucker auf den Träger aufgebracht werden (Abbildung 19D) sind schon seit einigen Jahren gebräuchlich. Obwohl doch auch ein Tintenstrahldrucker eine mit den Laserdruckern durchaus vergleichbare Auflösung schafft,

kann diese Auflösung bisher aber offensichtlich nur sehr mangelhaft für die kombinatorischen Synthesen „geerntet“ werden. Der Grund dafür liegt in den einander widersprechenden Anforderungen beim bedrucken eines Trägers mit Farbe bzw. mit Monomeren für die kombinatorische Synthese (Abbildung 20).

Die Brillanz der Ausdrücke von Tintenstrahldruckern wird dadurch erreicht, daß die Diffusion der verschiedenen Farbpartikel so gering wie möglich gehalten wird. Bewirkt wird dies durch die im Vergleich zu den Monomeren enorme Größe der Farbpartikel, und dadurch, daß die aufgedruckte Tonerflüssigkeit schnell flüchtige Substanzen enthält, sodaß die Farbpartikel sehr schnell ausgefällt werden. Zusätzlich wurden spezielle, stark saugfähige Hochglanzpapiere verwendet.

Diese meist hochkompliziert aufgebauten Papiere eignen sich in der Regel nicht als Träger für eine Molekülbibliothek und auch die beiden anderen Punkte widersprechen den Anforderungen an das koppeln einer möglichst dicht gepackten Molekülbibliothek:

1. Die Monomere sind sehr viel kleiner als die aufgedruckten Farbachromophoren, alleine diese Tatsache erhöht die Diffusionsrate enorm.
2. Die aufgedruckten Monomere dürfen nicht nur nicht in leicht flüchtigen Lösungsmitteln gelöst sein, im Gegenteil es ist kaum machbar ein Lösungsmittel zu finden, daß in den angestrebten Mengen im Bereich von Nanolitern nicht zu schnell verdampft, denn damit würden sich die Konzentrationen der Kopplungspartner in unerwünschter Weise verändern, denn die Kopplungsreaktion an den Träger braucht eine gewisse Zeit.

Dies ist der Grund, warum alle bisher verwendeten Spotmethoden sobald sie in kleinere Dimensionen vordringen, fehleranfällig und teuer sind. In diesen Dimensionen besteht immer die Gefahr, daß die aufgetragenen Spots verlaufen, wegspritzen, die Monomere zu weit diffundieren oder das Lösungsmittel teilweise oder ganz verdunstet.

Verglichen damit ist das drucken mit einem Laserdrucker eine sehr robuste und fehlertolerante Methode.

Vorstellen der neuen Methode

Prinzip eines Laserdruckers

Das Neue der hier vorgestellten Methode, ist der Einsatz eines Laserdruckers, um unterschiedliche Monomere möglichst dicht gepackt auf den Träger zu bringen. Abbildung 5 erklärt die Funktionsweise eines Laserdruckers:

1. der verwendete Toner besteht aus kleinen Polystyrolkugeln mit einem magnetischen Anteil
2. die Tonerpartikel haften aufgrund des magnetischen Anteils an einer Magnetwalze
3. eine Selenwalze wird durch das ein und ausschalten eines Lasers beschreiben, der die Selenwalze partiell entlädt (oder partiell auflädt)
4. da wo die Selenwalze definiert entladen wurde, können die Tonerpartikel aufgrund elektrischer Anziehungskräfte von der Magnetwalze auf die Selenwalze springen
5. von der Selenwalze springen die Tonerpartikel aufs Papier oder eine Kopierfolie und
6. werden durch eine heiße Walze eingeschmolzen

Kennzeichen des Laserdruckers ist also, daß trockene Tonerpartikel verwendet werden, deren Inhaltsstoffe nicht diffundieren. Die Partikel sind bei Raumtemperatur fest und werden durch eine heiße Walze (Abbildung 5, Nr. 6) nur kurz aufgeschmolzen. Dadurch werden sie dann auf dem Papier fixiert.

Moderne Laserdrucker, insbesondere Farblaserdrucker, erreichen dabei eine Brillanz des Ausdrucks, die fast schon an Fotoqualität heranreicht. Diese Brillanz reflektiert eine

extrem geringe Fehlerrate beim Übertragen der Tonerpartikel auf die Selenwalze. Eine Erklärung dafür liefern die zugrundeliegenden physikalischen Kräfte: Elektrostatische Anziehung oder Abstoßung sind, zumindest in diesen Dimensionen, die stärksten bekannten Kräfte in der Physik.

Träger für die Peptidbibliothek

Zunächst wird ein Träger benötigt, an den die aktivierten Aminosäuren gekoppelt werden können. Ein solcher Träger ist bereits bekannt: Ronald Frank hat am GBF in Braunschweig eine Methode zur Derivatisierung von ganz normalem Papier mit freien Aminogruppen entwickelt (Abbildung 6), an das dann fmoc geschützte Aminosäuren mit der für die Peptidsynthese üblicherweise verwendeten Standardchemie gekoppelt werden können (Tetrahedron Letters (1990) 31(12) pp1701).

Diese Methode wird als "SPOT Synthese von Peptiden" von mehreren Firmen kommerziell genutzt (u.a. von Jerini Biotools in Berlin).

Die von Ronald Frank entwickelte Methode ermöglicht außerdem eine sehr einfache Kontrolle, ob denn eine Kopplung der aufgetragenen Aminosäuren an den Träger stattgefunden hat. Dazu weist man die nach der Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe neu entstandenen freien Aminogruppen mit Bromphenolblau nach, das nicht kovalent an diese bindet (Abbildung 7).

Zunächst wird das Papier wie in Abbildung 6 beschrieben mit einer Schicht N-terminal geschützter Aminosäuren derivatisiert und anschließend die N-terminalen fmoc Schutzgruppen abgespalten. Dabei entstehen die in der Abbildung 7A grün eingefärbten zunächst freien Aminogruppen. Daran wird anschließend eine zweite Schicht fmoc geschützter Aminosäuren gekoppelt. Vor der Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppen werden diesmal die nicht abreagierten freien Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid verestert (rot eingefärbt in Abbildung 7A), sodaß nach der Abspaltung der Schutzgruppen nur die freien Aminogruppen nachweisbar sind, wo es vorher zu einer Kopplung an den Träger gekommen ist. In Abbildung 7B sind dies die intensiv blau gefärbten Bereiche, wo die zweite Schicht von Aminosäuren an den Träger gekoppelt wurde. In den helleren Bereichen sind dagegen die freien Aminogruppen, die der ersten Schicht von Aminosäuren entstammen, mit Essigsäureanhydrid verestert worden.

Herstellung eines "Aminosäurentoners"

In einem "Aminosäurentoner" werden mit einer Schutzgruppe versehene Aminosäuren in bei Raumtemperatur feste Partikel eingebunden. Das Ziel ist dabei, daß diese Partikel dann nach dem oben beschriebenen Prinzip des Laserdruckers definiert auf einen Träger gedruckt werden können. Um dies zu erreichen, müssen die Partikel im Laserdrucker von Walze zu Walze springen können (siehe Abbildung 5), d.h. sie sollten elektrisch aufladbar sein.

Für die kombinatorische Peptidsynthese müssen darüber hinaus die darin befindlichen Aminosäuren aus dem festen Matrixmaterial heraus "beweglich gemacht" werden können, denn nur dann können sie an einen Träger koppeln. Diese Kriterien werden von dem in Abbildung 8 gezeigten "Aminosäurentonerpartikel" erfüllt:

1. das Äquivalent der bei Raumtemperatur festen Polystyrolkugeln des normalen Toners ist dabei Diphenylformamid mit einem Schmelzpunkt bei etwa 71°C.
2. der magnetische Anteil wird in beiden Fällen von Magnetitpartikeln beigesteuert.

30.07.99

3. anstelle der Chromophoren enthält der "Aminosäurentoner" die mit einer N-terminalen Schutzgruppe versehenen aktivierten Aminosäuren.

Das Kriterium für die Auswahl von Diphenylformamid als bei Raumtemperatur "festes Lösungsmittel" ist seine Strukturähnlichkeit mit Dimethylformamid, das für die Standardpeptidsynthese verwendet wird. Abgesehen von den unterschiedlichen Aggregatzuständen bei Raumtemperatur sind damit keine großen Unterschiede im chemischen Verhalten zu erwarten.

Genau wie der normale Toner kann auch der "Aminosäurentoner" mittels einer heißen Walze fixiert werden, wobei die für die Standardsynthese verwendeten fmoc Aminosäuren kurzfristig ohne weiteres 150°C aushalten. Statt durch Hitze können die darin enthaltenen N-terminal geschützten Aminosäuren aber auch bei Raumtemperatur mithilfe eines Lösungsmittels wie Dichlormethan "beweglich gemacht" werden, also an den derivatisierten Träger koppeln. Dies kann sogar durch die Zufuhr von Dichlormethan-Dampf geschehen.

Sowohl Diphenylformamid, wie auch Magnetit stören die Kopplung der fmoc Aminosäuren an den Träger nicht (Abbildung 9 und 11). In Abbildung 9 wurden dabei die fmoc-Aminosäuren in DPF gelöst und aufgespottet, während in Abbildung 11 ein "Aminosäurentoner" aufgedruckt und anschließend die darin enthaltenen N-terminal geschützten Aminosäuren an den Träger gekoppelt wurden.

Aus den Bestandteilen des "Aminosäurentoners" (Magnetit, Diphenylformamid und die jeweiligen mit fmoc-Schutzgruppen versehenen Aminosäuren) müssen kleine, möglichst uniforme (ca 5µm große) Partikel hergestellt werden, da der Transfer der Partikel von der Magnetwalze zur Selenwalze im wesentlichen durch das Verhältnis von Ladung zu Masse bestimmt wird. Alle hier gezeigten "Aminosäurentoner" wurden dabei mithilfe einer Kaffemühle hergestellt, in einen Tonerbehälter gefüllt und anschließend in einem Laserdrucker auf Papier gedruckt.

Ein Vergleich der Druckqualität des normalen käuflichen Toners mit den verschiedenen "Aminosäurentonern" ergibt für den normalen Toner eine Auflösung von ca 40µm (Abbildung 10b), während bei den getesteten, verglichen mit dem Stand der Technik sehr primitiv hergestellten "Aminosäurentonern", die aufgedruckten Strukturen ab einer Größe von ca 120 - 200µm klar voneinander unterscheidbar sind (Abbildung 10).

Koppeln von aufgedruckten fmoc Aminosäuren

Abbildung 11B zeigt, daß die mit einem Laserdrucker aufgedruckten Aminosäuren an den Träger koppeln können. Zunächst wird das Papier dafür mit freien Aminogruppen derivatisiert, wie oben beschrieben. Dabei entstehen die in Abbildung 11A grün dargestellten, zunächst freien Aminogruppen. Anschließend wird der "Aminosäurentoner" aufgedruckt und die darin enthaltenen fmoc geschützten Aminosäuren an die in Abbildung 11A grün dargestellten freien Aminogruppen gekoppelt. Die nicht gekoppelten fmoc Aminosäuren werden gewaschen und die übriggebliebenen freien Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid verestert (in Abbildung 11A rot dargestellt). Anschließend werden die fmoc Schutzgruppen der aufgespotteten zweiten Schicht abgespalten und die dabei neu entstehenden freien Aminogruppen mit Bromphenolblau nachgewiesen. Das entstehende blaue Muster reflektiert diesmal die Orte, an denen die zweite Schicht von Aminosäuren aufgedruckt wurde.

Voraktivierte fmoc Aminosäuren

Vorzuziehen sind dabei voraktivierte fmoc-geschützte Aminosäuren, da sie im Vergleich zu normalen fmoc-geschützten Aminosäuren mit freiem Carboxyterminus bessere Kopplungseffizienzen ergeben. Abbildung 18 zeigt schematisch den Grund dafür: Aminosäuren mit freiem Carboxyterminus werden auf den Träger aufgedruckt und müssen danach durch einen Aktivator und eine Base aktiviert werden. Dabei entsteht ein reaktiver Ester (Abbildung 6, Nr.2), der anschließend mit den freien Aminogruppen des Trägers abreagiert.

Liegt der Aktivator allerdings im Überschuß vor, so gibt es darüberhinaus noch eine unerwünschte Nebenreaktion: Der Aktivator koppelt außerdem direkt an die zur Verfügung stehenden freien Aminogruppen des Trägers, wobei die Zahl der zur Verfügung stehenden freien Aminogruppen bei jedem Syntheszyklus abnimmt (Abbildung 18).

Im Unterschied zur Standardpeptidsynthese ist es sehr schwer möglich die Molaritäten der auf den Träger aufgetragenen fmoc Aminosäuren, des Aktivators und der Base exakt auszubalancieren, sodaß sich zur Lösung des Problems das Drucken von voraktivierten N-terminal geschützten Aminosäuren anbietet.

Anstelle der fmoc Aminosäuren können z.B. die entsprechenden Anhydride verwendet werden, diese sind allerdings etwa 5x teurer verglichen mit den normalen fmoc geschützten Aminosäuren. Daß dieser Weg prinzipiell funktioniert zeigt die Abbildung 11: Dort wurde ein Anhydrid von fmoc-Alanin auf den Träger gedruckt und gekoppelt. Daß diese Kopplung erfolgreich war zeigt sich dabei an der deutlichen Blaufärbung des gedruckten Musters (Abbildung 11).

Synthese eines Peptids mithilfe von aufgedruckten fmoc Aminosäuren (Beweis des Prinzips)

Im nächsten Versuch werden schachbrettartig zwei verschiedene Peptide auf einem Träger aus derivatisiertem Papier synthetisiert (Abbildung 12). Dabei werden zunächst wie oben beschrieben die den in Abbildung 12 farbig dargestellten Aminosäuren entsprechenden "Aminosäurentoner" hergestellt (siehe auch Abbildung 10). Die in Abbildung 12 mit einem farbigen Kreis markierten Aminosäuren werden in einem regelmäßigen Muster von Ovalen aufgedruckt, während die mit einem farbigen Rechteck markierten Aminosäuren als zweites Muster aus regelmäßig angeordneten Rechtecken gedruckt werden. Beide Muster greifen dabei schachbrettartig ineinander.

Die eckigen SPOTs entsprechen dabei dem Peptid *N-Terminus* DYKDDDDK.... *C-Terminus*, das von dem Maus monoklonalen Antikörper anti FLAG M1 Calcium abhängig (1mM CaCl₂) erkannt wird, während die runden SPOTs dem Peptid *N-Terminus* DDEETTDK.... *C-Terminus* entsprechen. Einige Streifen mit den schachbrettartig angeordneten Peptiden werden mit Milchpulver inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren und anschließend mit dem Maus monoklonalen Antikörper anti FLAG M1 und zur Kontrolle mit einem Aktin spezifischen monoklonalen Antikörper gefärbt.

In Abbildung 13B ist besonders auf der Vorderseite des derivatisierten Papiers ein graues Muster zu erkennen, das von den aufgedruckten Magnetitpartikel herrührt, die nicht vollständig gewaschen werden konnten. Dabei sind die aufgedruckten Ovale bzw. Rechtecke deutlich zu erkennen, die zu den Orten der oben beschriebenen Peptidsynthese korrespondieren.

In Abbildung 13B ist eine deutliche spezifische Reaktion des anti FLAG M1 Antikörpers zu sehen, die den rechteckigen Syntheseorten des FLAG-Peptids *N-Terminus* DDEETTDK.... *C-Terminus* entspricht. Ein Kontrollantikörper färbt diese Peptide nicht.

Dies zeigt, daß die kombinatorische Peptidsynthese mithilfe eines Laserdruckers prinzipiell möglich ist und daß die dazu benötigten "Aminosäuretoner" herstellbar sind. Die in den "Aminosäuretonern" enthaltenen fmoc geschützten Aminosäuren können nach dem Drucken offensichtlich auch noch an den Träger koppeln.

Das 5-fache übereinanderdrucken der Aminosäuretoner war dabei hinreichend genau, um eine deutliche spezifische Färbung auch der kleineren Rechtecke zu gewährleisten, wodurch mithilfe dieser Technik mit diesen Hilfsmitteln etwa 10.000 Peptide pro DinA4 Seite synthetisiert werden können.

Bau eines Prototypen

Um das gerade beschriebene enorme Potential eines Laserdruckers für die kombinatorische Synthese auch tatsächlich ernten zu können, muß zunächst die Qualität der "Aminosäuretoner" verbessert werden. Die bisher ziemlich primitiv mit einer Kaffeemühle hergestellten "Aminosäuretoner" schaffen derzeit eine Auflösung von ca 200-300µm, d.h. einzelne SPOTS mit etwa 300µm Abstand sind nach einem Druckvorgang deutlich voneinander zu unterscheiden (Abbildung 10). Hochgerechnet bedeutet dies, daß auf einer DinA4 Seite mit der vorgestellten Methode ca 300.000 SPOTS untergebracht werden könnten.

Für eine erfolgreiche kombinatorische Peptidsynthese in dieser Größenordnung muß jedoch noch eine weitere Voraussetzung erfüllt sein: Mehrere Lagen von "Aminosäuretonern" müssen möglichst exakt übereinander gedruckt werden können.

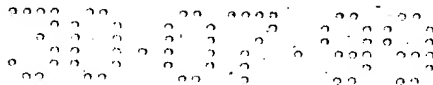
Genaueres Übereinanderdrucken

Die in Abbildung 13 gezeigte Peptidsynthese wurde mit einem normalen schwarz-weiß Laserdrucker durchgeführt, der das Papier auf etwa 1mm genau einzieht. Diese Genauigkeit des Papiereinzugs ermöglicht damit nur die Synthese von etwa 10.000 Peptiden pro DinA4 Seite. Das möglichst genaue Übereinanderdrucken verschiedener Schichten von fmoc-Aminosäuren ist also neben der Optimierung der "Aminosäuretoner" eine weitere Grundvoraussetzung für das "Ernten" der immensen Zahl von Bildpunkten, die ein Laserdrucker setzt.

Im folgenden sollen 2 Wege aufgezeigt werden, mit denen das genaue Übereinanderdrucken mehrerer Tonschichten erreicht wird. Kernstück beider Wege ist der Einsatz eines Farblasersdruckers (Abbildung 15).

Die meisten Farblasersdrucker verwenden die in Abbildung 15 gezeigte Lösung, um ihre vier verschiedenen Farben exakt nebeneinander zu setzen. Sie benützen zwei große Walzen, die mechanisch exakt miteinander gekoppelt sind. Auf die eine Walze schreibt der Laser das elektrostatische Bild der ersten Farbe, dann springen auf die vom Laser bestrichenen Teile die Farbpartikel von einer Magnetwalze über und werden auf das Papier, das auf der zweiten "Trägerwalze" fest fixiert ist übertragen. Dort werden diese Farbteilchen fixiert, während der Laser das elektrostatische Bild der zweiten, danach der dritten und der vierten Farbe schreibt. Da das Papier die ganze Zeit über auf der "Trägerwalze" fixiert wird, stimmt die räumliche Zuordnung der Farben zueinander ganz exakt (<1µm Abweichung). Erst wenn die letzte Tonschicht auf das Papier übertragen wurde, wird die Fixierung an die "Trägerwalze" gelöst.

Dieses Verfahren gewährleistet, daß unterschiedliche Tonerpartikel räumlich exakt nebeneinander, oder im Falle von Mischfarben auch übereinander gedruckt werden. Es kann rel. einfach auch auf 20 oder mehr verschiedene Tonerpartikel ausgedehnt werden.



Dazu muß nur die Wechseltrommel, die im Farblaserdrucker die 4 verschiedenen Farbtöne mit den jeweiligen Magnetwalzen an die Selenwalze heranführt, durch eine Wechseltrommel mit 20 oder mehr unterschiedlichen Tonerbehältnissen ausgetauscht wird.

Dies würde es ermöglichen, ganz analog zur Funktionsweise des Farblaserdruckers beim Farbdruck, eine Schicht mit allen 20 unterschiedlichen Aminosäuren räumlich exakt auf den Träger aufzubringen. Wird die Fixierung des derivatisierten Papiers (oder eines anderen Trägers für die Peptidbibliothek) an die „Trägerwalze“ allerdings danach gelöst, so geht die genaue Ortsinformation verloren, da diese in der Kopplung der „Trägerwalze“ mit der Selenwalze (und damit mit der Position des Lasers) begründet ist.

Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen besteht darin, die Fixierung des Trägers an die „Trägerwalze“ während der gesamten Peptidsynthese aufrecht zu erhalten. Das bedeutet, daß alle Syntheszyklen inklusive aller Waschschritte und dem Zuführen diverser Kopplungsreagentien auf der „Trägerwalze“ stattfinden müssen.

Abbildung 15b zeigt damit schematisch eine Art Peptid-Synthesizer, mit einem Farblaserdrucker als Herzstück. Im Unterschied zu einem normalen Farblaserdrucker (Abbildung 15) ist in Abbildung 15b die heiße Walze (Nr.6) durch eine Vorrichtung ersetzt worden, die es ermöglicht Kopplungsreagentien oder Waschlösungen in gasförmigem oder in flüssigem Zustand in Kontakt mit der sich drehenden „Trägerwalze“ zu bringen. Gasförmige Substanzen werden mithilfe einer breiten Düse zugeführt (nicht dargestellt), während Flüssigkeiten durch ein Endlosband in Kontakt mit dem auf der „Trägerwalze“ fixierten Träger der Molekülbibliothek gebracht werden.

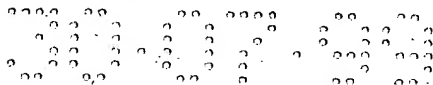
Der zweite Weg, der zum genauen Übereinanderdrucken mehrerer Tonschichten führt, ist in Abbildung 16 dargestellt. Bei diesem Weg wird die Peptidsynthese nicht direkt auf der „Trägerwalze“ durchgeführt, stattdessen wird der Part des Farblaserdruckers auf das Drucken der „Aminosäuretoner“ beschränkt. Synthese und Waschzyklen für die Peptidsynthese finden außerhalb des Farblaserdruckers statt.

Um die einzelnen Tonschichten trotzdem exakt übereinandersetzen zu können, bedarf es bei diesem Weg einer Rückkopplung, wobei ein auf den Träger aufgebrachtes Muster von einer Scannereinheit abgerastert wird, die eine eventuelle Abweichung (auch Verzerrungen innerhalb des Trägers) erkennt und elektronisch korrigiert. Diese elektronische Korrektur kommt ohne mechanische Teile aus, da jedem abgespeicherten Bildpunkt einfach ein Vektor zugeordnet werden kann, der den Laser und damit auch den entsprechenden Tonerpartikel genau um den Korrekturbetrag dieses Vektors verschiebt.

Eine Kombination dieses zweiten Wegs mit dem ersten Weg bietet sich insbesondere dann an, wenn besonders dicht gepackte Peptidbibliotheken synthetisiert werden sollen, oder wenn eine „on-line“ Qualitätskontrolle der einzelnen Syntheseschichten gebraucht wird. In diesem Fall könnte mithilfe der Scannereinheit SPOT für SPOT und Schicht für Schicht die Intensität der Blaufärbung durch Bromphenolblau überprüft werden und damit nach jedem einzelnen Syntheseschritt die Menge an neu entstandenen freien Aminogruppen nach der Abspaltung der fmoc Schutzgruppen. Anstelle der Blaufärbung mit Bromphenolblau kann natürlich auch die charakteristische Absorption der fmoc Schutzgruppe nachgewiesen werden.

Andere Träger für die Molekülbibliothek

Um die große Zahl an möglichen Bildpunkten (= letztendlich an unterschiedlichen Peptiden) ernten zu können, muß eine weitere Voraussetzung erfüllt sein. Die Trägerfolie sollte sich möglichst wenig in sich verziehen. Nicht alle Papiersorten sind dabei die erste Wahl, Papier kann jedoch auch durch Kopierfolien ersetzt werden. Diese bestehen aus Polystyrol, das wiederum das Standardträgermaterial in der klassischen Peptidsynthese ist.



Ein weiterer Vorteil der Polystyrolfolien ist ihre Durchsichtigkeit, die bei vielen Nachweissystemen von Vorteil ist.

Anwendungsbeispiele

Die vorgestellte Methode ermöglicht eine Vielzahl von Anwendungen auch in der kombinatorische Chemie oder in der Synthese von Oligonukleotiden. Die folgenden drei Beispiele beschränken sich jedoch auf die Synthese von Peptiden. Diese Beispiele basieren insbesondere auf dem in Abbildung 15b aufgezeigten Weg, mit dem es möglich ist Arrays mit Millionen von Peptiden kostengünstig herzustellen. Alle drei Beispiele beschreiben wenige, standardisierte Produkte, für die es eine Vielzahl von möglichen Anwendungen gibt.

Drei Beispiele für die Anwendung von Peptidarrays

1. Synthese von Unigeneproduct Filtern

Der Mensch besitzt ca. 100.000 Gene, die durchschnittlich etwas weniger als 500 Aminosäuren codieren. In wenigen Jahren werden über 90% dieser Gene bekannt sein. Wenn man jedes dieser Genprodukte durch durchschnittlich 100 überlappende 15er Peptide abdeckt, die jeweils um 5 AS gegeneinander verschoben sind, so werden ca. 10 Millionen verschiedene Peptide benötigt, um alle menschlichen Genprodukte abzudecken. In Abbildung 23 ist ein solcher Filter schematisch dargestellt. Als Zwischenziele bieten sich dabei Expressionsarrays an, die jeweils nur einen Teil der menschlichen Genprodukte abdecken, z.B. „Onkogenarrays“, „Immunologiearrays“ etc.

Diese Filter sind der Ausgangspunkt für eine Vielzahl von Versuchen (Abbildung 23x):

1. Epitopbestimmung von monoklonalen Antikörpern
2. Analyse des Serums von Autoimmunpatienten (z.B. bei Rheuma)
==> welche Epitope werden erkannt?
3. Analyse des Serums von Patienten, die Krankheiten mit bisher unbekannten Ursachen haben
==> sind z.B. Multiple Sklerose oder Parkinson Autoimmunkrankheiten?
4. Analyse des Serums von Krebspatienten
==> welche Epitope werden erkannt?
(wahrscheinlich haben Krebspatienten einen Titer gegen körpereigene Antigene)
5. Suche nach Interaktionspartnern
==> an welche Peptide binden diverse HIV Genprodukte?

2. Synthese einer vollständigen Tetra oder Pentapeptidbibliothek mit dem Endziel einer vollständigen Hexapeptidbibliothek

Die Reaktion von im Blutserum befindlichen Antikörpern mit Antigen wird schon seit sehr vielen Jahren für die Diagnose von Krankheiten genutzt. Ein großer Teil des Repertoires von geschätzt $>10^8$ verschiedenen Antikörpern, über die der Mensch verfügt, kann dabei auch an kleine Penta oder Hexapeptide binden, sodaß durch die Bindung an eine vollständige Penta- oder Hexapeptidbibliothek (Abbildung 24) das Vorhandensein von sehr vielen unterschiedlichen Antikörpern im Blutserum gleichzeitig nachgewiesen werden kann.

Unterschiedliche Gruppen von Antikörpern reflektieren dabei die Immunantwort eines Patienten gegen unterschiedliche Krankheitserreger oder Krankheitszustände wie Autoimmunkrankheiten, Allergien, vielleicht auch von Erkrankungen wie Schlaganfall oder Herzinfarkt. Darüber hinaus korrelieren offensichtlich auch Krebserkrankungen mit dem Auftreten spezifischer Antikörper im Blutserum von Patienten (siehe v.a. die Arbeiten der Gruppe von Prof. Pfreundschuh aus Homburg an der Saar).

Wie schon beim ersten Beispiel ist die Zielsetzung in diesem Fall das Erkennen von Teilmustern von Bindungsereignissen, die mit Krankheitsbildern korrelieren (Abbildung 25x). Einmal identifizierte Teilmuster wiederum ermöglichen die parallele Diagnose (oder den Ausschluß) von sehr vielen unterschiedlichen Erkrankungen.

Je größer die Komplexität der Peptidbibliothek, desto sicherer können dabei dem Patientenserum reproduzierbar ein Muster von Peptid-spezifischen Antikörperreaktivitäten zugeordnet werden. Einander ähnliche Teilmuster reflektieren dabei eine ähnliche (Krankheits-) Vorgeschichte. Somit eignet sich dieses Verfahren für das Auffinden diagnostischer Marker, die wiederum für die parallele Diagnose vieler unterschiedlicher Krankheiten mithilfe eines einzigen standardisierten Produktes benützt werden können.

Richtig spannend wirds, wenn man ein Muster von Bindungsereignissen mit Krankheiten korreliert, von denen man bisher nicht weiß, was ihre Ursache ist, denn dies ermöglicht Rückschlüsse auf die Ursache (oder bisher unbekannte Begleitumstände) der Krankheit. Kandidaten für eine solche Vorgehensweise sind z.B. Alzheimer, Parkinson, Multiple Sklerose, Herzinfarkt, Schlaganfall und viele mehr.

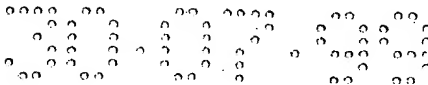
Getestet werden kann dieses Prinzip mit dem Serum von Patienten mit Magengeschwüren. Dabei sollten Peptide erkannt werden, die ihre Entsprechung im Genom von *Helicobacter pylori* finden (Abbildung 25).

3. Synthese von D-Peptid-Filtern

Im dritten Beispiel wird durch die oben beschriebene Technik eine beschleunigte Suche nach Leitstrukturen für die Therapie ermöglicht. Wie im zweiten Beispiel beschrieben, werden Arrays von vollständigen Peptidbibliotheken synthetisiert, die diesmal jedoch nicht aus den natürlicherweise vorkommenden L-Aminosäuren, sondern aus ihren Spiegelbildern, den D-Aminosäuren, synthetisiert werden. D-Peptide eignen sich als potentielle Therapeutika, da uns Menschen die abbauenden Enzyme dafür fehlen.

In Abbildung 26 wird ein solcher Array von D-Peptiden mit einer Protease gefärbt, die mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen wird (blaue Färbung). Dadurch können Bindungsmodule identifiziert werden, die die Fähigkeit besitzen diese Protease spezifisch zu binden.

Steht ein Enzymnachweis für die Aktivität dieser Protease zur Verfügung, so kann die Peptid gebundene Protease auch damit nachgewiesen werden. Finden sich jetzt bei einem Vergleich der beiden Färbemuster Peptide, die das Enzym zwar binden, aber gleichzeitig seine Aktivität blockieren, so hat man mit diesen die Bausteine für ein potenciales Therapeutikum in der Hand.



Beschreibung der Abbildungen

Abbildung 3

Kombinatorische Synthese:

- Monomere werden auf den Träger aufgebracht
- die unterschiedlichen Monomere werden an den Träger gekoppelt
- die nicht gekoppelten Monomere werden gewaschen
- die Schutzgruppen werden abgespalten
- erneut werden Monomere auf den Träger aufgebracht und der nächste Zyklus beginnt.

Abbildung 4

Komplexität kombinatorischer Peptidbibliotheken

Abbildung 5

Funktionsweise eines Laserdruckers:

- 1: Tonerpartikel bestehen aus kleinen Polystyrolkugeln mit einem magnetischen Anteil
- 2: die Tonerpartikel haften aufgrund des magnetischen Anteils an einer Magnetwalze
- 3: ein Laser entlädt partiell die Selenwalze (durch ein und ausschalten)
- 4: aufgrund elektrischer Anziehungskräfte springen die Tonerpartikel von der Magnetwalze auf die Selenwalze
- 5: von der Selenwalze springen die Tonerpartikel aufs Papier oder eine Kopierfolie und
- 6: werden durch eine heiße Walze eingeschmolzen

Abbildung 6

Mit Aminogruppen derivatisiertes Papier:

Die Carboxylgruppe von N-terminal geschützten Aminosäuren wird aktiviert und koppelt daraufhin an die freien Hydroxylgruppen von Papier. Nach der Abspaltung der fmoc Schutzgruppe entstehen auf dem Papier freie Aminogruppen, die durch die nicht kovalente Bindung an Bromphenolblau nachgewiesen werden können.

Abbildung 7

SPOT Synthese:

Papier wird mit einer ersten Schicht von fmoc geschützten Aminosäuren derivatisiert, nicht gekoppelte fmoc Aminosäuren werden gewaschen, und die fmoc Schutzgruppen der ersten Schicht mit Base abgespalten.

Eine zweite Schicht von fmoc geschützten Aminosäuren wird an definierten Orten aufgespottet, wiederum die nicht gekoppelten fmoc Aminosäuren werden gewaschen und die übriggebliebenen freien Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid verestert.

Anschließend werden die fmoc Schutzgruppen der aufgespotteten zweiten Schicht abgespalten und die dabei entstehenden freien Aminogruppen mit Bromphenolblau nachgewiesen.

Das entstehende blaue Muster reflektiert die Orte, an denen die zweite Schicht von Aminosäuren aufgespottet wurde (Abbildung 7B).

Abbildung 8

Schematischer Vergleich der Partikel eines normalen Toners mit einem "Aminosäurentoner":

- das Äquivalent der bei Raumtemperatur festen Polystyrolkugeln des normalen Toners ist Diphenylformamid mit einem Schmelzpunkt bei etwa 71°C.
- der magnetische Anteil wird in beiden Fällen von Magnetitpartikeln beigesteuert.
- anstelle der Chromophoren enthält der "Aminosäurentoner" die mit einer N-terminalen Schutzgruppe versehenen aktivierten Aminosäuren.

**Abbildung 9**

Die Kopplung an den Träger funktioniert in Anwesenheit von Diphenylformamid (DPF) genau so gut wie in Anwesenheit von 1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP): Aminosäuren mit N-terminaler fmoc Schutzgruppe werden in DPF bzw. in NMP gelöst und auf derivatisiertes Papier gespottet. Anschließend wird der in NMP gelöste Aktivator HBTU (1-H-Benzotriazole-1-yl 1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) darübergespottet und die Reaktion durch Zugabe von drei verschiedenen Basen gestartet. Nach 30 Minuten bei 65°C werden die nicht gekoppelten Aminosäuren gewaschen und übrig gebliebene freie Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid verestert. Die nach der Abspaltung der fmoc Schutzgruppe neu entstandenen freien Aminogruppen werden mit Bromphenolblau nachgewiesen.

Abbildung 10

Vergleich der Druckqualität von normalem källichem Toner mit verschiedenen "Aminosäurentonern":

Die verschiedenen Toner wurden in eine Tonerkassette gefüllt und mit einem Laserdrucker auf normales Papier gedruckt. Die Färbung der "Aminosäurentoner" kommt durch die darin enthaltenen Magnetitpartikel zustande.

Abbildung 10b

Handelsübliche Laserdrucker haben eine Auflösung von 600dpi, d.h. die einzelnen Punkte, die diese Geräte drucken, haben einen Durchmesser von ca. 40µm. Handelsübliche Scanner mit 4.800dpi raster das Objekt mit ca. 5µm großen Schritten ab. Das Abrastern des eingescannten Laserdruckbildes bei hoher Vergrößerung zeigt typischerweise keinen einzigen falsch gesetzten Pixel.

Abbildung 11

Papier wird mit einer ersten Schicht von fmoc geschützten Aminosäuren derivatisiert, nicht gekoppelte fmoc Aminosäuren gewaschen, und die fmoc Schutzgruppen der ersten Schicht mit Base abgespalten. Dabei entstehen die in Abbildung 11A grün dargestellten freien Aminogruppen.

Eine zweite Schicht von fmoc geschützten Aminosäuren wird an definierten Orten aufgedruckt und koppelt an die grün dargestellten freien Aminogruppen. Anschließend werden wiederum die nicht gekoppelten fmoc Aminosäuren gewaschen und die übriggebliebenen freien Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid verestert. Danach werden die fmoc Schutzgruppen der aufgedruckten zweiten Schicht abgespalten und die dabei neu entstehenden freien Aminogruppen mit Bromphenolblau nachgewiesen. Das entstehende blaue Muster reflektiert die Orte, an denen die zweite Schicht von Aminosäuren aufgedruckt wurde.

Abbildung 12

An die freien Aminogruppen von derivatisiertem Papier wird uniform nacheinander Lysin gefolgt von Asparaginsäure gekoppelt. Anschließend werden schachbrettartig zwei verschiedene Peptide auf einem Träger aus derivatisiertem Papier synthetisiert. Dabei werden wie oben beschrieben die den in Abbildung 12 farbig dargestellten Aminosäuren entsprechenden "Aminosäurentoner" hergestellt. Die in Abbildung 12 mit einem farbigen Kreis markierten Aminosäuren werden in einem regelmäßigen Muster von Ovalen aufgedruckt, während die mit einem farbigen Rechteck markierten Aminosäuren als zweites Muster aus regelmäßig angeordneten Rechtecken gedruckt werden. Beide Muster greifen dabei schachbrettartig ineinander. Die N-terminale Aminosäure Asparaginsäure wird anschließend in einem letzten Schritt wieder uniform an den Träger gekoppelt, gefolgt vom Abspalten der Schutzgruppen.

Abbildung 13

Die Synthesorte der bei (A) dargestellten Peptide korrespondieren zu den bei (B) sichtbaren grauen Ovalen bzw. Rechtecken. Die Papierstreifen werden mit Milchpulver in PBS geblockt und mit anti FLAG M1 Antikörper bzw. mit einem anti Aktin Antikörper inkubiert. Der Nachweis des gebundenen 1. Antikörpers erfolgt mit Peroxidase konjugiertem Ziege anti Maus Antikörper (rotes Substrat) bzw. mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Ziege anti Maus Antikörper (blaues Substrat).

Abbildung 14

Kennzahlen eines Laserdruckers

Abbildung 15

Funktionsweise eines Farblaserdruckers:

Wie beim schwarz-weiß Laserdrucker (Abbildung 5) bestehen beim Farblaserdrucker die Tonerpartikel aus kleinen Polystyrolkugeln mit einem magnetischen Anteil. Sie haften aufgrund des magnetischen Anteils an einer Magnetwalze und springen von dort aufgrund elektrischer Anziehungskräfte auf die vom Laserstrahl beschriebene Selenwalze. Von dort springen die Tonerpartikel aufs Papier oder eine Kopierfolie und werden durch eine heiße Walze eingeschmolzen.

Im Unterschied zum schwarz-weiß Laserdrucker, muß ein Farblaserdrucker jedoch nicht nur einen Toner aufdrucken, sondern 4 verschiedenfarbige Tonerpartikel exakt nebeneinander drucken. Die Abbildung zeigt schematisch wie dieses Problem gelöst wird:

- die Selenwalze ist wesentlich größer als beim schwarz-weiß Laserdrucker
- damit kann der Laser ein ganzes Blatt auf diese Walze „schreiben“
- der Laser „beschreibt“ die Selenwalze mit der ersten Farbe
- eine Magnetwalze, die den ersten Farbtoner transportiert fährt an die Selenwalze heran
- von dort springen die Tonerpartikel auf die „beschriebene“ Selenwalze
- die Selenwalze ist eng mit einer genauso großen zweiten Walze gekoppelt
- auf diese Walze wird ein Blatt Papier aufgezogen und dort fixiert
- die beiden Walzen drehen sich gegeneinander
- damit wird der erste Toner auf das Papier übertragen, das fixiert bleibt
- der Laser „beschreibt“ die Selenwalze mit der zweiten Farbe
- anschließend fahren weitere Wechsellmagnetwalzen an die Selenwalze heran
- die die weiteren Farben auf die Selenwalze und von dort auf das Papier übertragen
- erst wenn der gesamte Druckvorgang abgeschlossen ist, wird das Papier freigegeben

Abbildung 15b

Gerät für die kombinatorische Synthese:

Im Unterschied zu Abbildung 15 ist in dieser Abbildung die heiße Walze (Nr.6) durch eine Vorrichtung ersetzt worden, die es ermöglicht Kopplungsreagentien oder Waschlösungen in gasförmigem oder in flüssigem Zustand in Kontakt mit der sich drehenden „Trägerwalze“ zu bringen. Gasförmige Substanzen werden mithilfe einer breiten Düse zugeführt (nicht dargestellt), während Flüssigkeiten durch ein Endlosband in Kontakt mit dem auf der „Trägerwalze“ fixierten Träger der Molekülbibliothek gebracht werden. Die Wechsellmagnetwalze mit den 4 verschiedenfarbigen Tonern wird ausgetauscht gegen eine Wechsellmagnetwalze mit den 20 verschiedenen „Aminosäuretonern“.

Abbildung 16

Elektronisch nachjustierbarer Farblaserdrucker:

Eine Scannereinheit rastert ein auf den Träger aufgebrachtes Muster ab und vergleicht es mit demselben, bereits gespeicherten Muster. Wird dabei eine Abweichung vom Sollwert festgestellt, so wird das Bild, das in den Druckerspeicher geladen wird, elektronisch um diese Abweichung verschoben.

Abbildung 18

Werden normale fmoc-geschützte Aminosäuren mit freiem Carboxyterminus auf einen Träger gebracht, so müssen diese danach durch einen Aktivator und eine Base aktiviert werden. Dabei entsteht ein reaktiver Ester (siehe auch Abbildung 6, Nr.2), der sofort mit den freien Aminogruppen des Trägers abreagiert. Liegt der Aktivator allerdings im Überschuß vor, so gibt es darüberhinaus noch eine unerwünschte Nebenreaktion: Der Aktivator koppelt außerdem direkt an die zur Verfügung stehenden freien Aminogruppen des Trägers, wobei die Zahl der zur Verfügung stehenden freien Aminogruppen bei jedem Synthesesyklus abnimmt. Werden dagegen voraktivierte Aminosäuren gedruckt, so wird die Gefahr dieser Nebenreaktion vermieden. Die Abbildung zeigt als Beispiel einer solchen Voraktivierung ein Aminosäurenanhydrid, wodurch die Kopplungseffizienzen deutlich erhöht werden.

Abbildung 19A + 19B

Verfahren für die kombinatorische Synthese

Bei den gebräuchlichen lithographischen Syntheseverfahren wird aufgrund der Einwirkung von Licht der Syntheseort für die aktivierten Monomere zugänglich gemacht (Abbildung 19A), oder aber es werden lichtempfindliche Schutzgruppen abgespalten (Abbildung 19B), wodurch eine lokal definierbare Kettenverlängerung ermöglicht wird. Ein Vorteil beider Verfahren ist ihre hohe Auflösung. Ein Nachteil beider Verfahren ist, daß nacheinander der gesamte Synthesesyklus für jedes einzelnes Monomer durchlaufen wird, was auf Kosten der Qualität geht.

Abbildung 19C + 19D

Abbildung 19D beschreibt das spotten (oder drucken mit einem Tintenstrahldrucker) von Monomeren auf einen Träger. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, daß parallel eine ganze Schicht von unterschiedlichen Monomeren auf den Träger aufgebracht werden kann und nicht jede Monomerart gesondert gekoppelt werden muß. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die rel. schlechte Auflösung.

In Abbildung 19C ist das oben im Text vorgestellte Verfahren dargestellt. Es kombiniert die Vorteile der anderen Methoden. Auch hier wird wie bei den lithographischen Verfahren die hohe Auflösung von Laserlicht ausgenützt, um eine dicht gepackte Molekülbibliothek zu erhalten. Andererseits kann auch damit parallel eine ganze Schicht von unterschiedlichen Monomeren auf den Träger aufgebracht werden.

Abbildung 20

Nachteile des spottens von Monomeren

Wenn Papier mit Farbe bedruckt wird, so dürfen die gedruckten Chromophoren möglichst wenig diffundieren, da dies die Brillanz des gedruckten Bildes stören würde. Erreicht wird dies dadurch, daß aufgrund von schnellflüchtigen Bestandteilen in den verwendeten Tonerflüssigkeiten die aufgetragenen Chromophoren sehr schnell an Ort und Stelle fixiert werden. Darüberhinaus sind die verwendeten Chromophoren rel. groß, was ihre Diffusionsrate erheblich einschränkt. Außerdem werden spezielle, stark saugfähige Hochglanzpapiere verwendet.

Die aufgetragenen Monomere (für eine kombinatorische Synthese) werden dagegen sehr viel weiter diffundieren, da das für die Synthese verwendete Lösungsmittel sehr schlecht flüchtig ist, da Zeit für die Kopplung der Reaktionspartner gebraucht wird. Die verwendeten Monomere sind darüberhinaus vergleichsweise klein, was ihre Diffusionsrate erheblich erhöht. Spezialpapiere eignen sich normalerweise nicht als Träger einer Molekülbibliothek.

Abbildung 21

Bei allen Druckverfahren wird immer eine ganze Schicht von unterschiedlichen Monomeren auf den Träger aufgebracht, die dann alle zusammen einen Kopplungszyklus durchlaufen bevor wiederum die nächste Schicht von Monomeren aufgedruckt wird. Bei den in Abbildung 19A & 19B dargestellten lithographischen Syntheseverfahren dagegen muß jede Art von Monomer nacheinander einzeln aufgebracht, gekoppelt und überschüssige Monomere gewaschen werden. Dies bedeutet, daß für die Synthese desselben Arrays von Oligomeren, die lithographischen Synthesemethoden $N \times$ mehr Kopplungszyklen durchlaufen müssen als bei den Druckverfahren nötig (Abbildung 19C & 19D). Die Zahl N steht dabei für die Anzahl unterschiedlicher Monomere, d.h. für die Synthese eines Arrays von Oligopeptiden brauchen die lithographischen Synthesen $20 \times$ mehr Kopplungszyklen verglichen mit den Druckverfahren.

Abbildung 22**konfokales Lasermikroskop**

Affymetrix scannt seine Arrays mithilfe eines konfokalen Lasermikroskops ab. Dabei müssen jedoch alle 3 Dimensionen des Raums durchsucht werden, bis das gewünschte Signal eindeutig identifiziert werden kann. Verglichen damit ist ein Scanner viel schneller:

1. Er hat nicht nur einen Laser zur Verfügung sondern arbeitet parallel mit einem eindimensionalen Array von Leuchtdioden.
2. Da das Licht der Leuchtdioden nahezu parallel den Träger durchstrahlt, fällt beim Scanner das suchen in der dritten Dimension des Raumes weg.

Abbildung 23

Die ca 100.000 Gene des Menschen codieren durchschnittlich etwas weniger als 500 Aminosäuren pro Gen. In wenigen Jahren werden die meisten dieser Gene bekannt sein. Jedes dieser Genprodukte kann durch durchschnittlich 100 überlappende 15er Peptide repräsentiert werden, die jeweils um 5 AS gegeneinander verschoben sind. Insgesamt werden dann ca 10 Millionen verschiedene Peptide benötigt, um das ganze menschliche Genom abzudecken.

Abbildung 23x

Anwendungsbeispiele für das in Abbildung 23 beschriebene Array von Genprodukten.

Abbildung 24**„Vollständige“ Peptidbibliotheken**

Arrays der dargestellten Decamergemische können mithilfe des weiter oben beschriebenen Verfahrens auf einem Träger synthetisiert werden. Dabei werden auf dem Array alle denkbaren Kombinationen der mit N bezeichneten Aminosäuren abgedeckt.

Abbildung 25**Korrelation von Krankheit mit Peptidmuster**

Die differentielle Färbung eines hochkomplexen Arrays von Peptiden mit Kontrollserum und dem Serum von Patienten ermöglicht die Identifizierung von Patienten spezifischen Färbemustern. Damit können mehrere Krankheiten parallel diagnostiziert werden, oder umgekehrt mithilfe der aufgefundenen Peptide bisher unbekannten Krankheitsursachen nachgespürt werden. Im angegebenen Beispiel werden Peptide identifiziert, die exprimierten Genprodukten von *Helicobacter pylori* entsprechen, dem Verursacher von Magengeschwüren.

3333 33 33 3333 33 33 33
3333 33 33 3333 33 33 33
3333 33 33 3333 33 33 33
3333 33 33 3333 33 33 33

Abbildung 25x

Anwendungen für das Array einer Penta oder Hexapeptidbibliothek.

Abbildung 26

Suche nach Enzyminhibitoren

Zwei verschiedene Enzymnachweise ermöglichen die differentielle Identifizierung von Peptiden, die das Enzym zwar binden, aber gleichzeitig seine Enzymaktivität blockieren. Diese Module von D-Peptiden eignen sich als Bausteine für potentielle Therapeutika.

30. JUL '99 (FR) 20:20
CASTELL
+49 2421 405010

Patentansprüche

Verfahren und Vorrichtungen zum Aufbringen von Substanzen, insbesondere von Molekülen auf einen Träger,

dadurch gekennzeichnet,

- daß eine immobilisierte Substanz durch Veränderung der physikalischen Umgebung, insbesondere der Matrixschicht, beweglich gemacht wird,
- daß die so beweglich gemachte Substanz durch einen physikalischen Prozeß in die Nähe des Trägers, insbesondere der Trägersoberfläche, gebracht wird,
- daß die so beweglich gemachte Substanz an auf dem Träger befindliche Moleküle oder Atome bindet, oder ein Aggregat bildet, oder mit diesen eine chemische Reaktion eingeht,
- daß die so beweglich gemachten Substanzen viele unterschiedliche Substanzen sind oder ergeben.

Anspruch 2

Verfahren und Vorrichtungen nach Anspruch 1, wobei die in Anspruch 1 genannte Substanz in Partikeln immobilisiert wird.

Anspruch 3

Verfahren und Vorrichtungen nach Anspruch 1 und 2, wobei die in Anspruch 2 genannten Partikel aufgrund physikalischer Prozesse ortsgenau in die Nähe eines Trägers gebracht werden.

Anspruch 4

Verfahren und Vorrichtungen nach Anspruch 1 bis 3, wobei der ortsgenaue Transfer der Partikel nach Anspruch 3 mithilfe eines Laserdruckers, insbesondere eines Farblaserdruckers erfolgt.

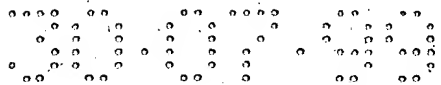
Anspruch 5

Verfahren und Vorrichtungen nach Anspruch 4, wobei die Tonerpartikel eines Laserdruckers, insbesondere eines Farblaserdruckers, mit den in Anspruch 2 genannten Partikeln ersetzt werden.

Anspruch 6

Verfahren und Vorrichtungen nach Anspruch 1 bis 5, wobei in einem repetitiven Prozeß die genannten Partikel wiederholt ortsgenau auf den Träger aufgebracht werden, jeweils

2



Kombinatorische Peptidsynthese mithilfe eines Laserdruckers

Zusammenfassung

Ziel der vorgestellten Methode ist die kombinatorische Synthese eines Arrays von möglichst vielen, möglichst dicht gepackten Peptiden auf einem Träger. Das Neue dieser Methode, ist der Einsatz eines Laserdruckers, um unterschiedliche Monomere möglichst dicht gepackt auf den Träger zu bringen. Ein Laserdrucker funktioniert wie folgt:

1. der verwendete Toner besteht aus kleinen Polystyrolkugeln mit einem magnetischen Anteil
2. die Tonerpartikel haften aufgrund des magnetischen Anteils an einer Magnetwalze
3. eine Selenwalze wird durch das Ein- und Ausschalten eines Lasers beschrieben, der die Selenwalze partiell entlädt
4. da wo die Selenwalze definiert entladen wurde, können die Tonerpartikel aufgrund elektrischer Anziehungskräfte von der Magnetwalze auf die Selenwalze springen
5. von der Selenwalze springen die Tonerpartikel aufs Papier oder eine Kopierfolie und
6. werden durch eine heiße Walze eingeschmolzen.

Ganz analog zum normalen Toner wurde ein "Aminosäuretoner" hergestellt, wobei anstelle der Chromophoren mit einer Schutzgruppe versehene Aminosäuren in bei Raumtemperatur feste Partikel eingebunden sind. Das Äquivalent der bei Raumtemperatur festen Polystyrolkugeln des normalen Toners ist dabei Diphenylformamid mit einem Schmelzpunkt bei etwa 71°C. Diese Partikel können nach dem oben beschriebenen Prinzip des Laserdruckers definiert auf einen Träger gedruckt und darüberhinaus an einen Träger gekoppelt werden.

Der Beweis des Prinzips erfolgte durch die Synthese eines Peptids unter Einsatz eines Laserdruckers, wobei das synthetisierte Peptid mithilfe eines monoklonalen Antikörpers nachgewiesen werden konnte.

Um die immense Zahl von Bildpunkten, die ein Laserdrucker auflösen kann, in eine ähnlich große Zahl von Peptiden zu überführen, wird der Prototyp eines Peptidsynthesizers gebaut, dessen Herzstück aus einem Farblaserdrucker besteht. Moderne Farblaserdrucker ermöglichen die exakte räumliche Zuordnung von 4 Farben, was in einem rel. einfachen Eingriff auf 20 oder mehr verschiedene Toner ausgedehnt werden kann. Diese räumliche Zuordnung kann sehr einfach auch für die darauffolgenden Schichten von aufgedruckten Aminosäuren beibehalten werden, dann nämlich, wenn vor dem aufdrucken der jeweils nächsten Schicht von Aminosäuren eine Kopplungsreaktion auf dem rel. zur Selenwalze fixierten Träger stattfindet.

Es gibt zahlreiche Anwendungen für hochkomplexe Peptidarrays, beispielsweise können etwa 10 Millionen 15mere auf einem Filter alle menschlichen Genprodukte repräsentieren. Die damit erhaltenen Serumprofile ermöglichen Rückschlüsse auf Autoimmunkrankheiten, Krebskrankheiten und evtl. auf Krankheiten unbekannter Ursache. Ein solcher Array hilft auch bei der Suche nach Interaktionspartnern, beispielsweise von viralen Genprodukten.

Anmerkung:

Die „Selenwalze“ enthält mittlerweile kein Selen mehr, sondern ein Laser-beschreibbares organisches Material.

Kombinatorische Synthese

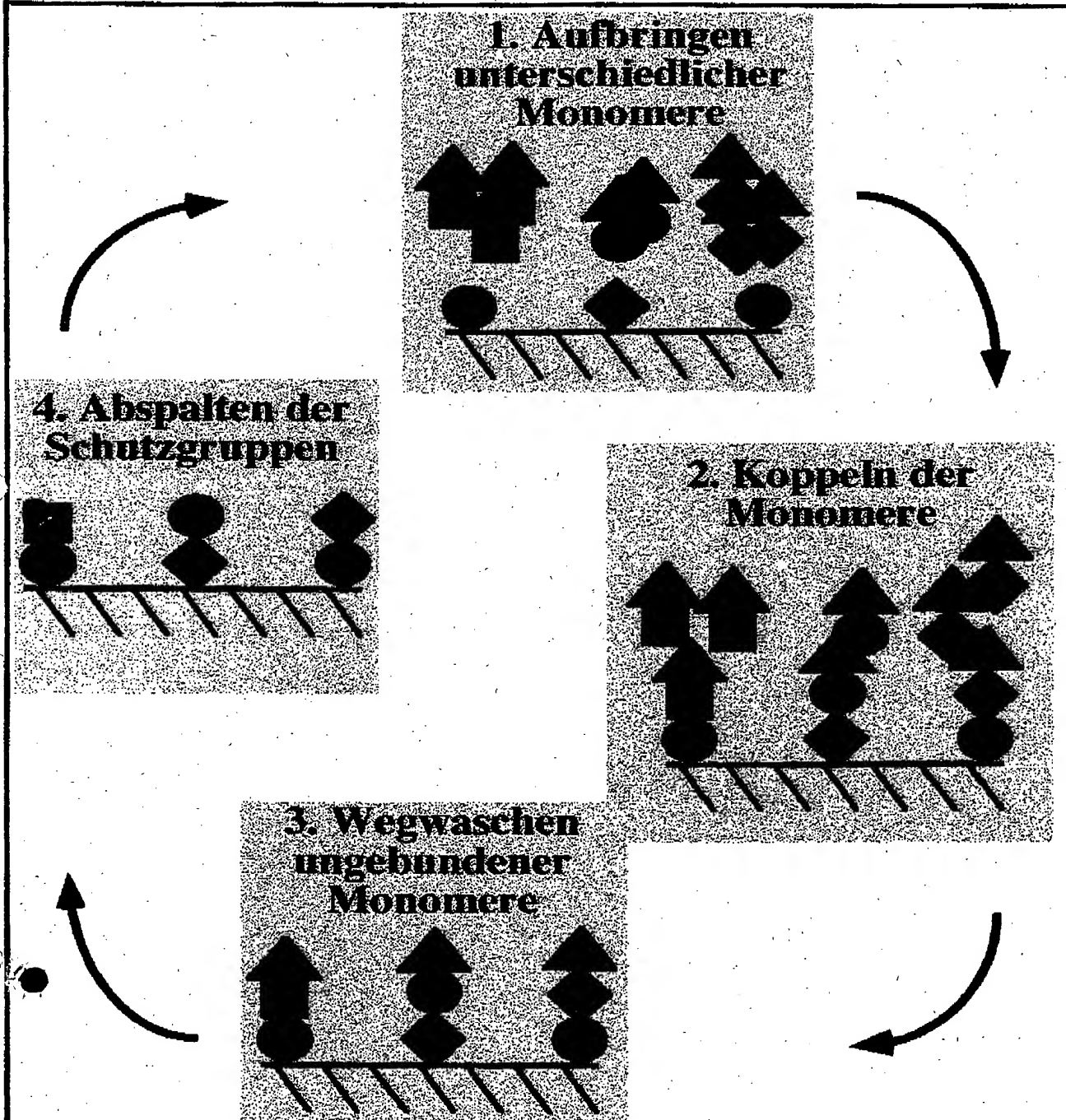
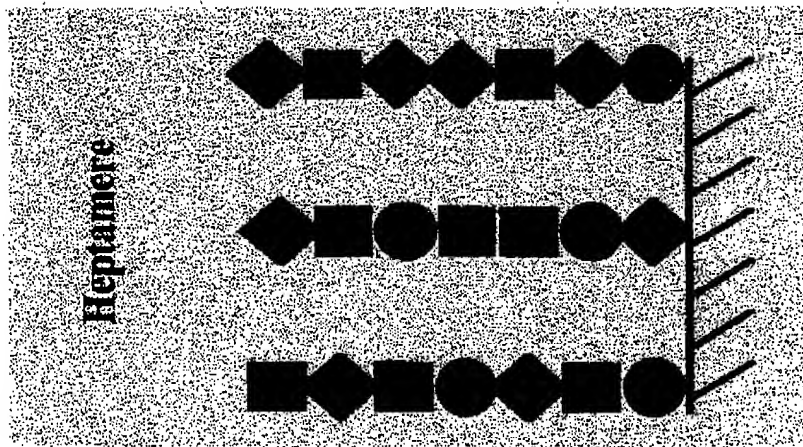


Abb. 3

Komplexität kombinatorischer Peptidbibliotheken



$20^1 = 20$ verschiedene Aminosäuren

$20^2 = 400$ verschiedene Dipeptide

$20^3 = 8.000$ verschiedene Tripeptide

$20^4 = 160.000$ verschiedene Tetrapeptide

$20^5 = 3,2$ millionen verschiedene Pentapeptide

$20^6 = 64$ millionen verschiedene Hexapeptide

$20^7 = 1.280$ millionen verschiedene Heptapeptide

Abb. 4 Abb. 4

Funktionsweise eines Laserdruckers

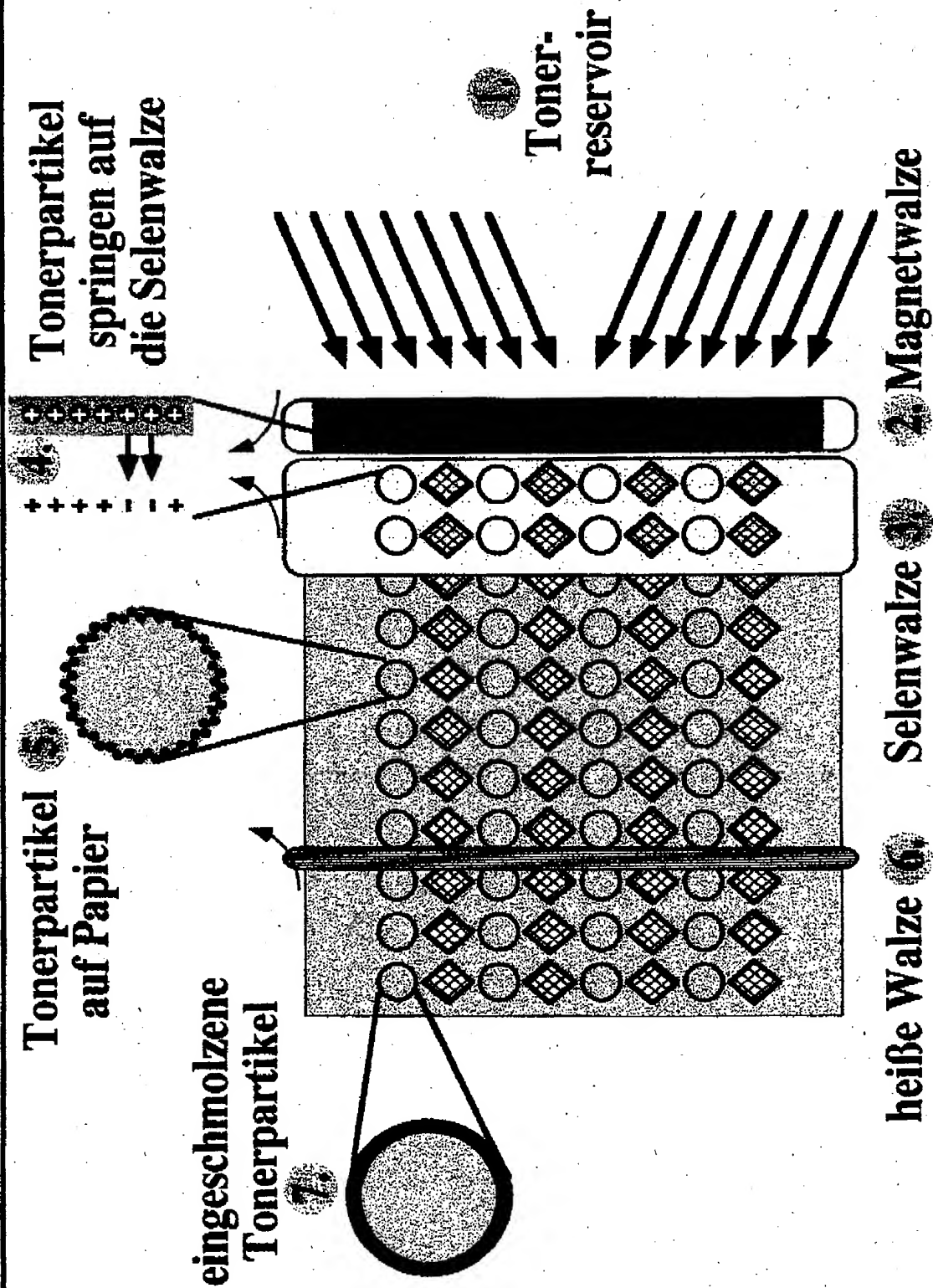


Abb. 5

Derivatisiertes Papier als Träger für die Peptidsynthese

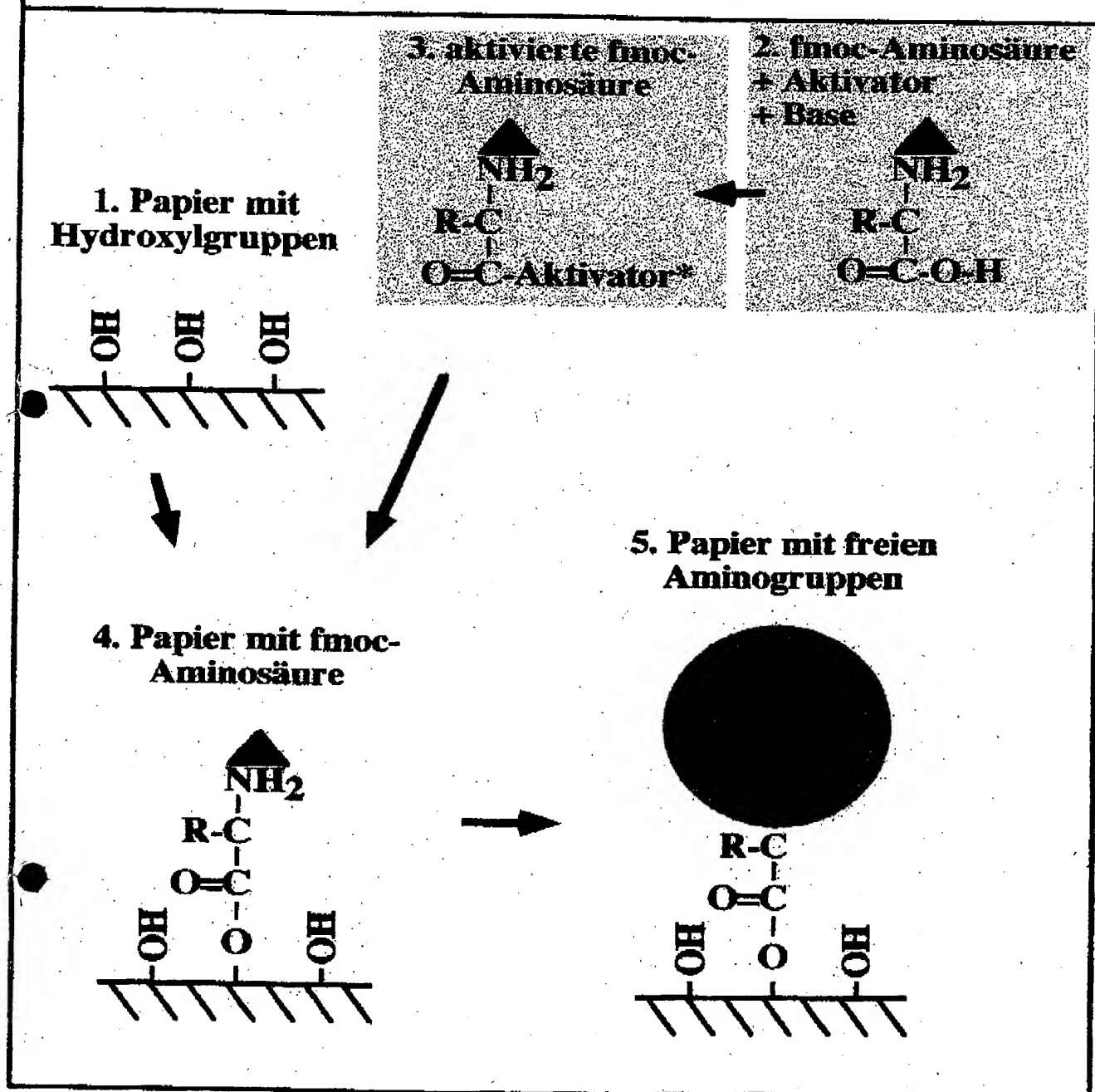


Abb. 6 Abb. 6

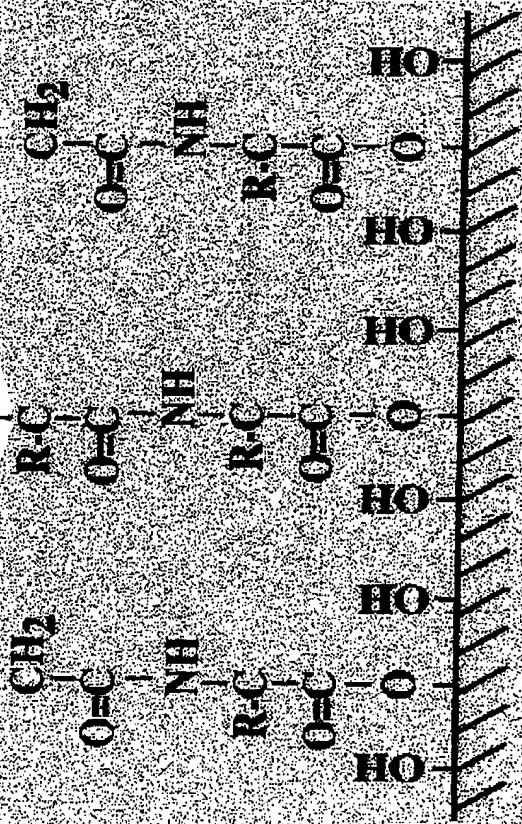
Nachweis von freien Aminogruppen mit Bromphenolblau

A SPOTs mit freien Aminogruppen

Brom-phenol-blau

NH₂

Essig-säure-amid



B SPOTs

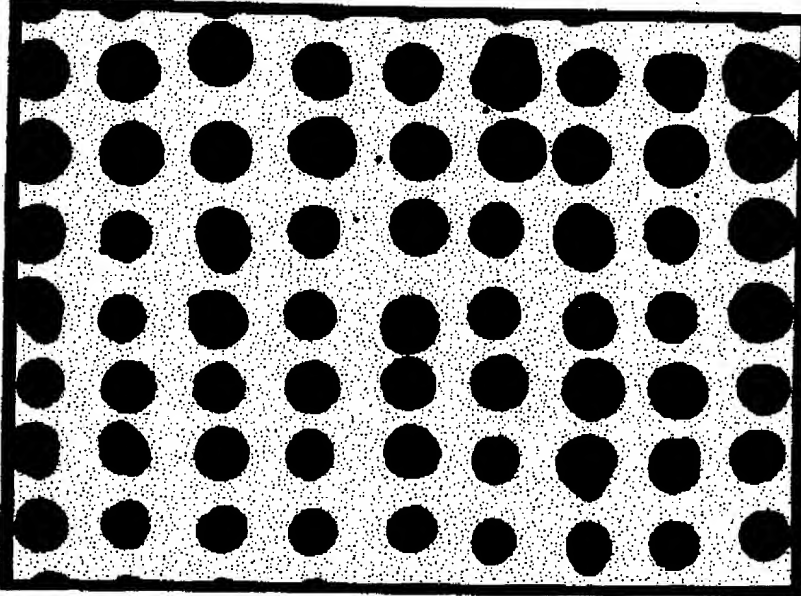
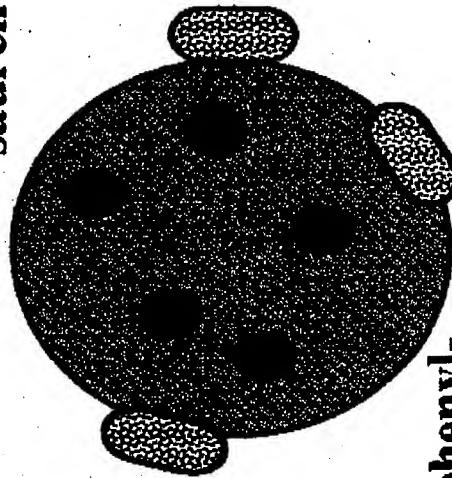


Abb. 7

Aminosäuren-Tonerpartikel

**Aminosäuren-
Tonerpartikel**

fmoc-
Amino-
säuren

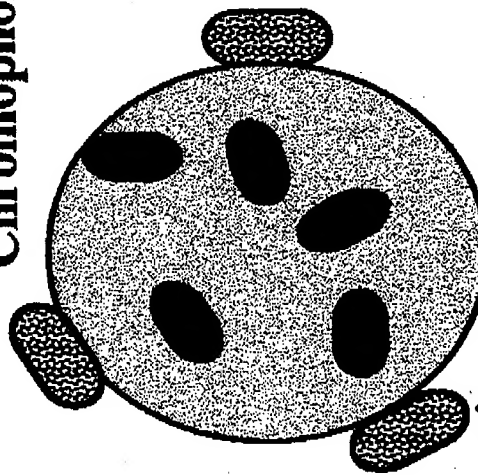


Diphenyl-
formamid

Magnetit

**normale
Tonerpartikel**

Chromophoren

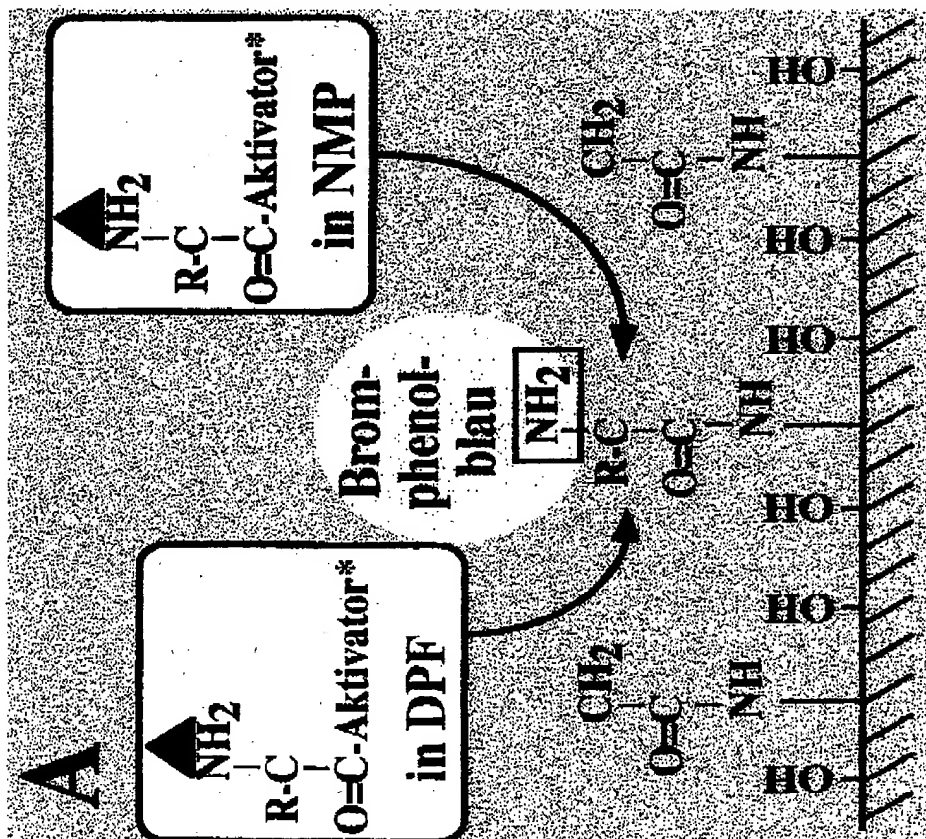


Magnetit

Polystyrol

Abb. 8

Die Kopplung an den Träger funktioniert in Anwesenheit von Diphenylformamid (DPF)



Aktivator: HBTU in NMP



Fmoc-Alanine in:

DPF



DEF

NMP

DPF

ZMP

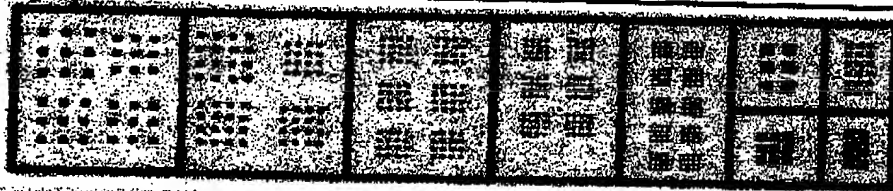
Base 1

Base 2

Base 3

466.8

Aminosäuren mit Schutzgruppen können mithilfe eines Laserdruckers gedruckt werden

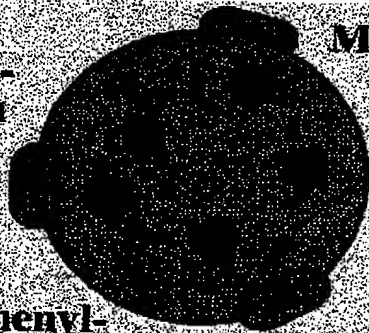


normaler
Toner

fmoc-
Amino-
säuren

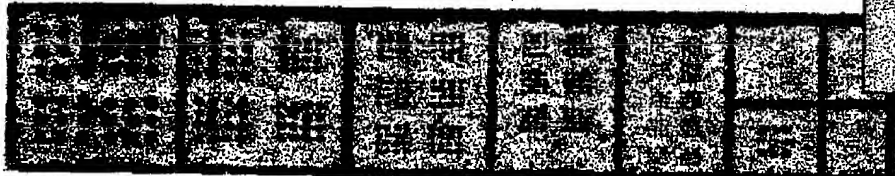
Magnetit

Diphenyl-
formamid



Papier

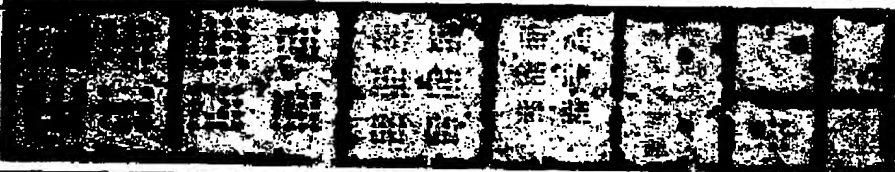
1 cm



fmoc-Ala



fmoc-Lys



fmoc-Thr

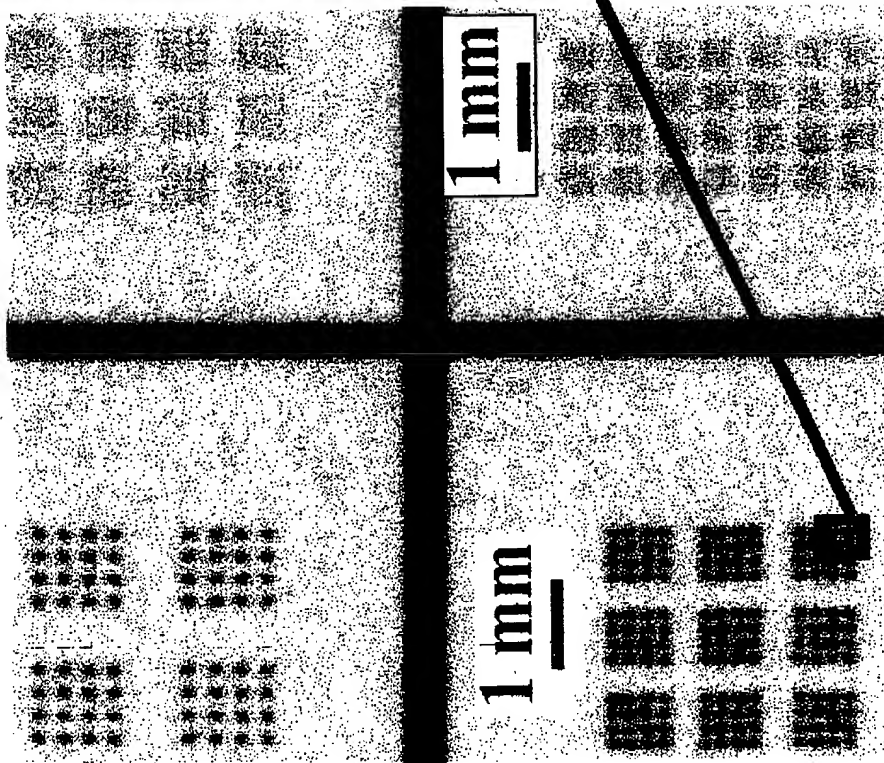


fmoc-Asp

Abb. 10

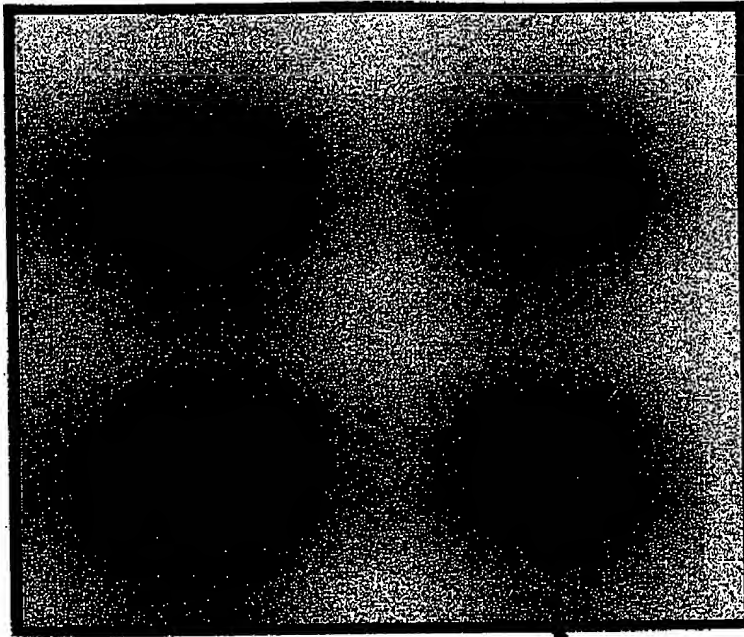
Die Auflösung handelsüblicher Geräte:

Laserdrucker mit 600dpi



normaler Toner

Scanner mit 4.800dpi



50 μ m

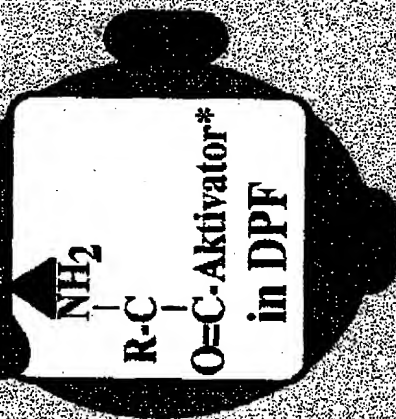
normaler Toner

20.07.99 Abb 106

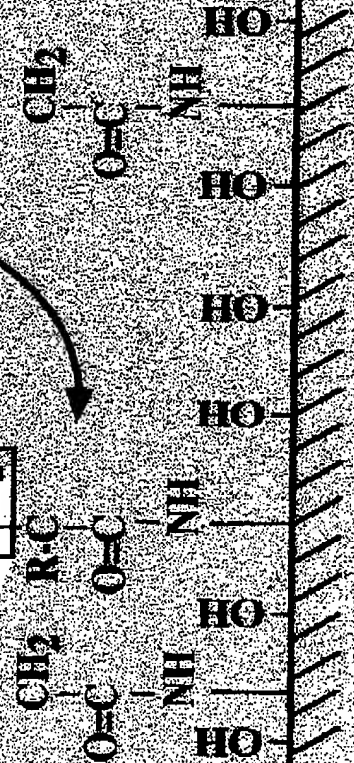
Aufgedruckte Aminosäuren können an den Träger gekoppelt werden



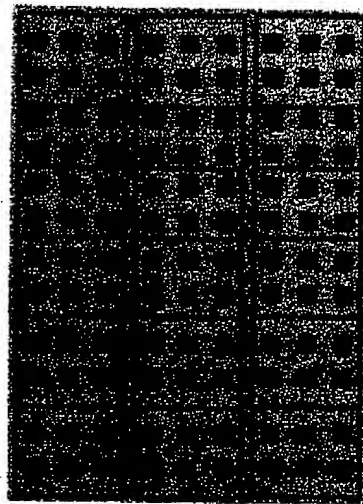
Magnetit



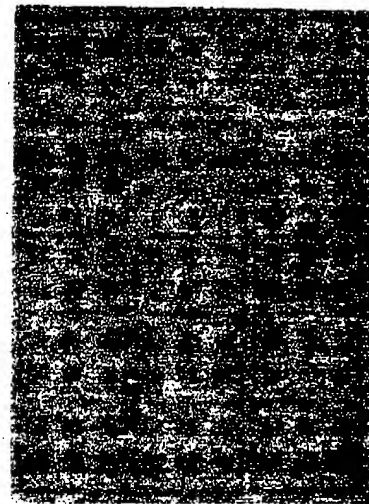
Brom-phenol-blau



B normales Druckbild



gekoppelte Aminosäure



ALL 11

Synthese von 2 Peptiden mithilfe eines Laserdruckers

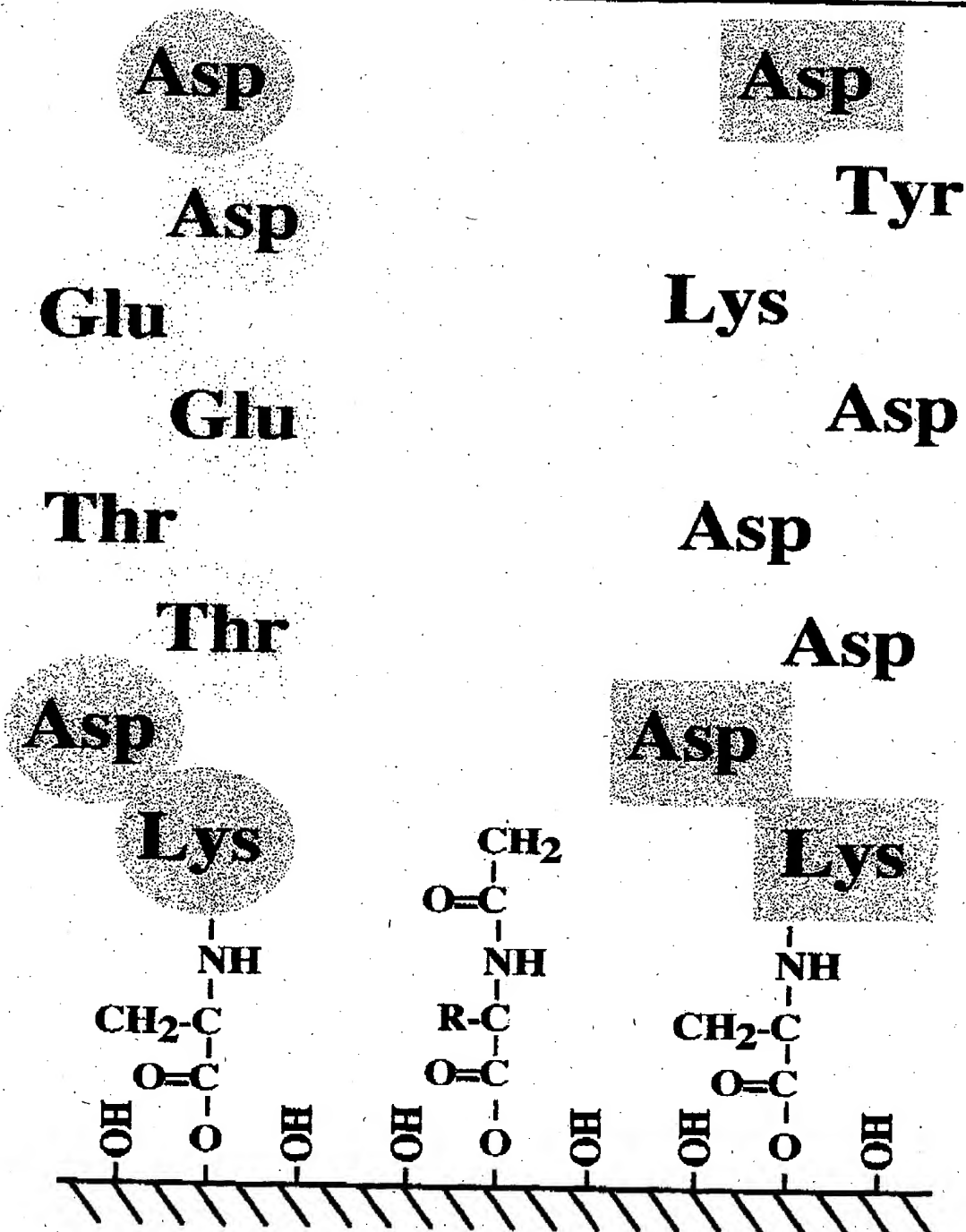


Abb. 12

Mithilfe eines Laserdruckers synthetisierte Peptide werden von einem monoklonalen Antikörper erkannt

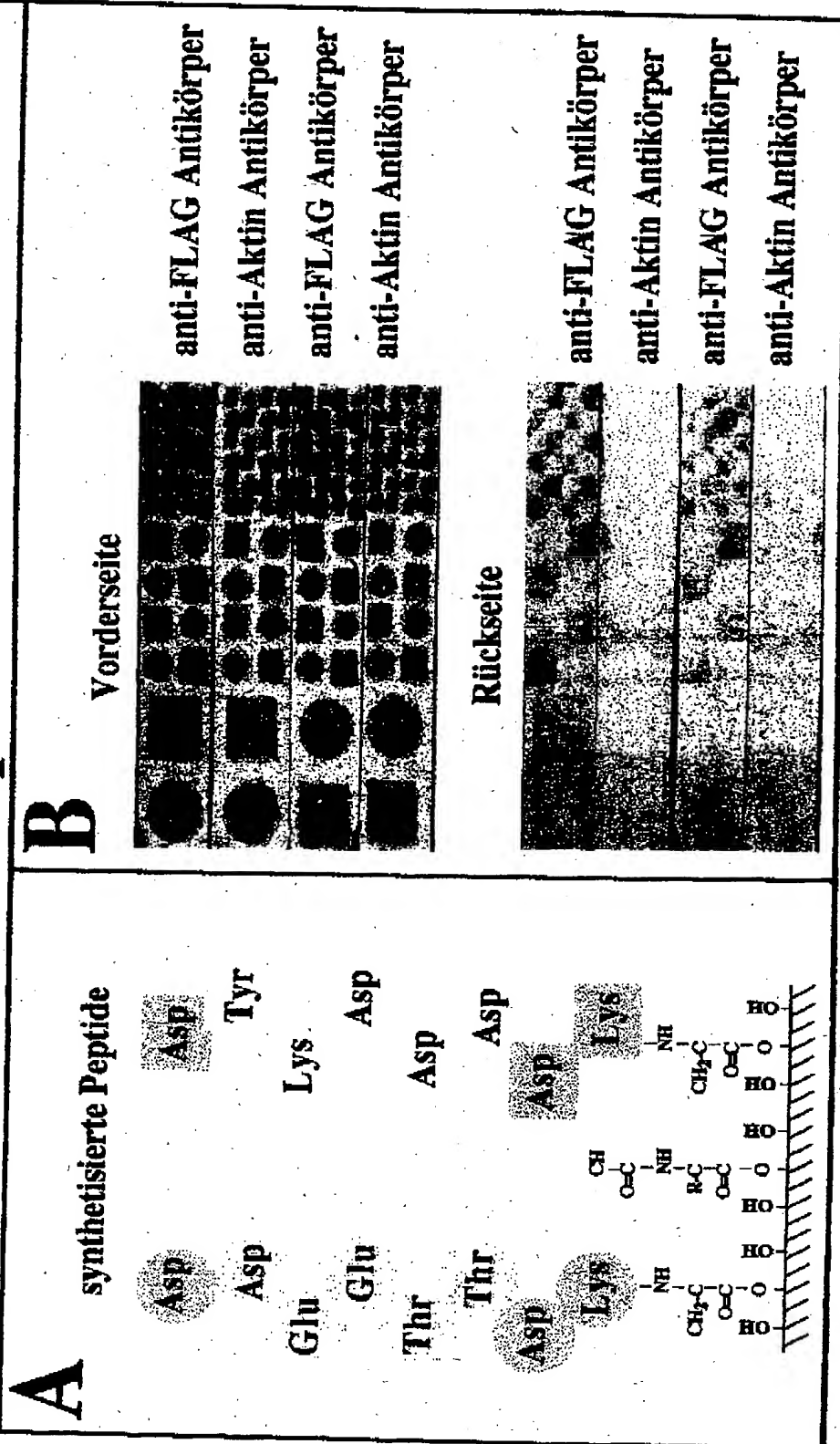
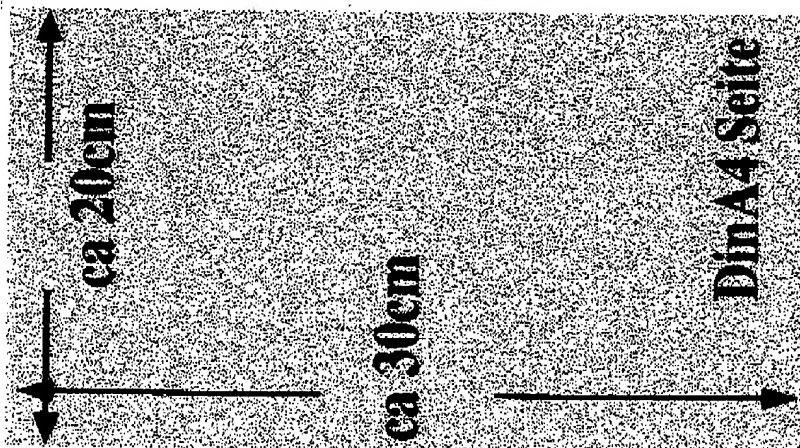


Abb. 13

Kennzahlen eines Laserdruckers



600 dpi = 600 dots per inch

600 dpi = ca 1 dot alle $40\mu\text{m}$

1.200 dpi = ca 1 dot alle $20\mu\text{m}$

2.400 dpi = ca 1 dot alle $10\mu\text{m}$

4.800 dpi = ca 1 dot alle $5\mu\text{m}$

Dots pro DinA4 Seite:

600 dpi = ca 5.000×7.500 = ca 30 millionen dots

1.200 dpi = ca 10.000×15.000 = ca 125 millionen dots

2.400 dpi = ca 20.000×30.000 = ca 500 millionen dots

4.800 dpi = ca 40.000×60.000 = ca 2 milliarden dots

Abb. 14

Funktionsweise eines Farblaserdruckers

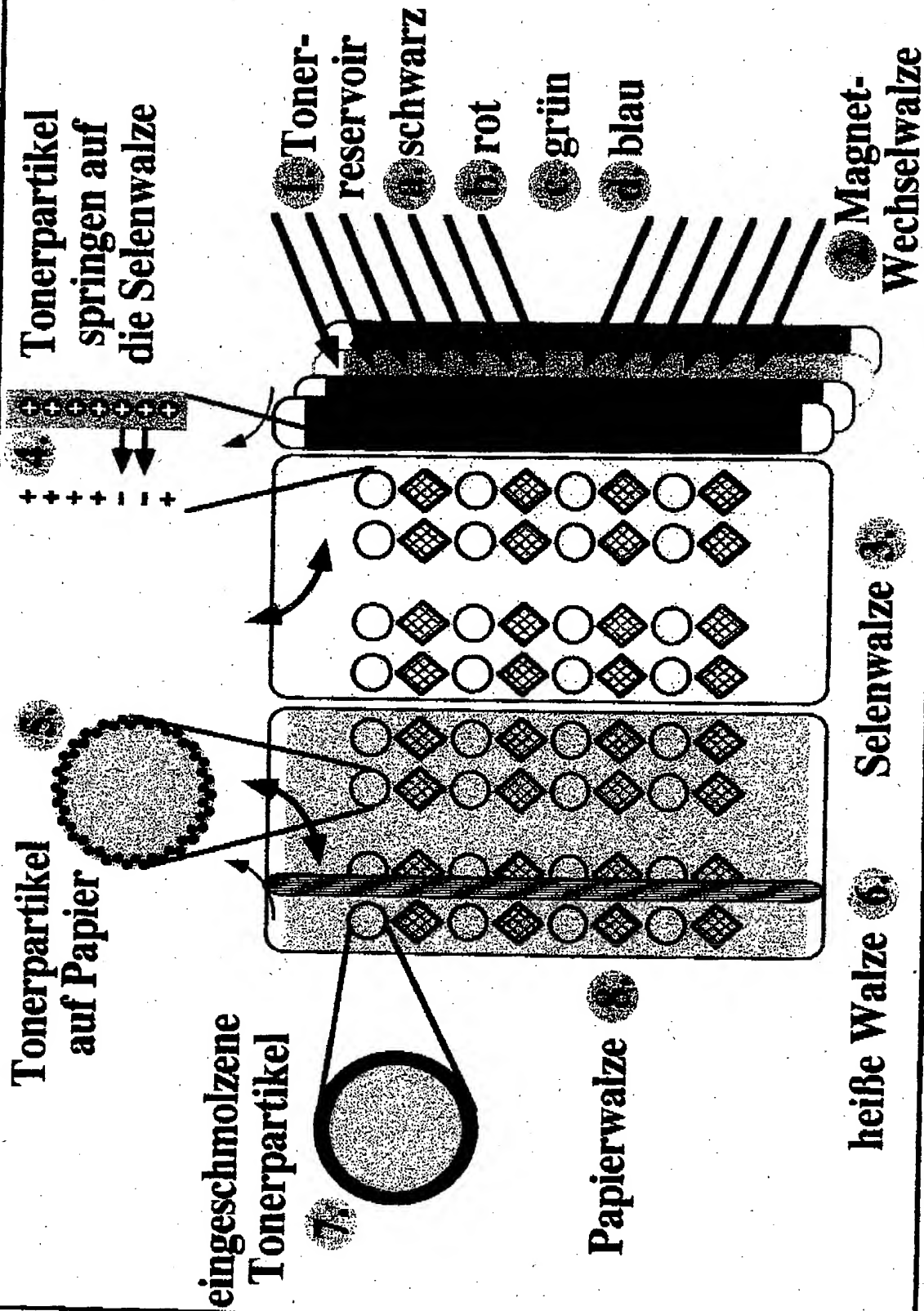


Abb. 15 Abb. 15

Peptidsynthese mit einem Farblaserdrucker

statt heißer Walze:
Zufuhr von Gas oder
Lösungsmittel

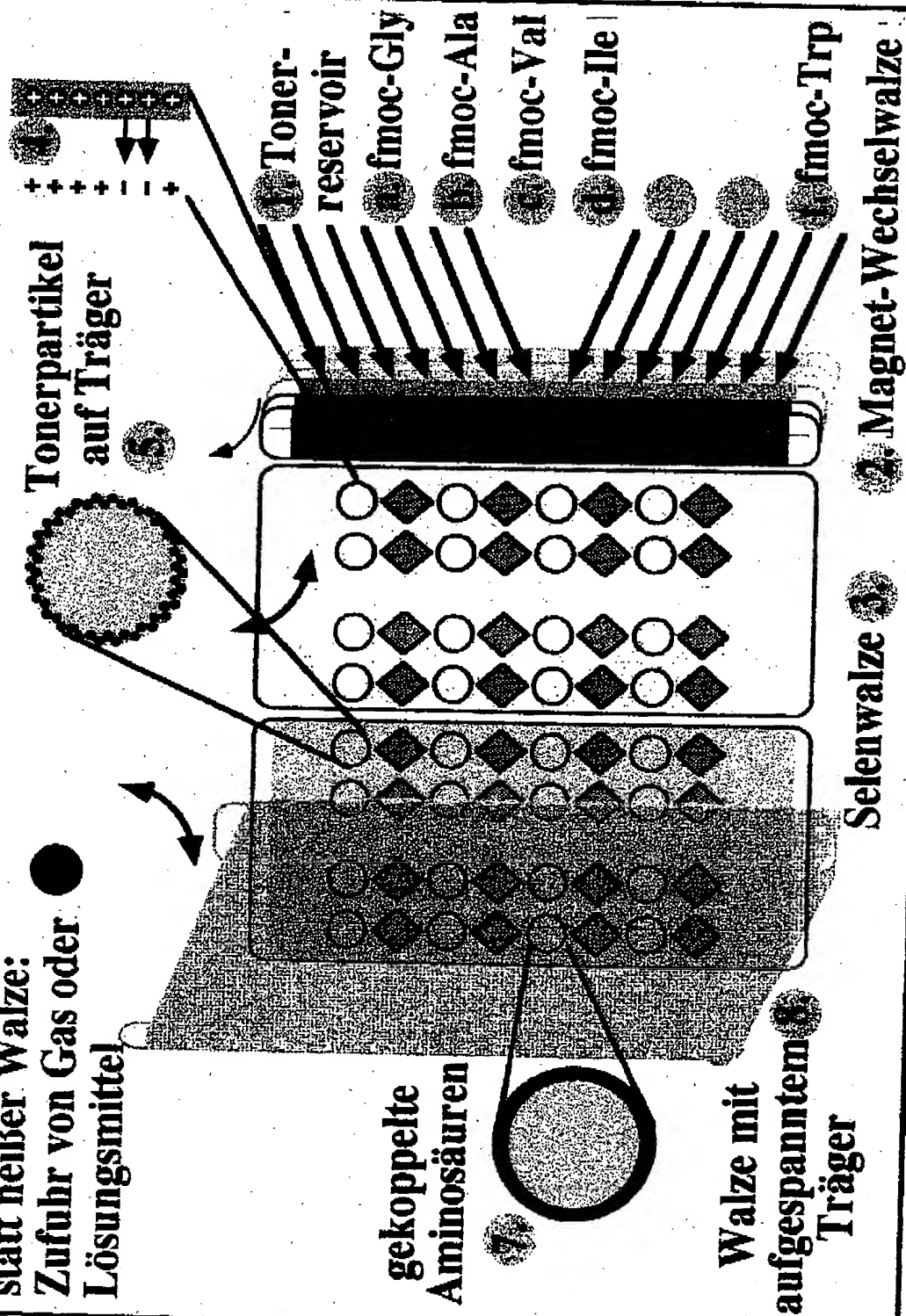


Abb 15b

Nachjustieren mithilfe eines Scanners

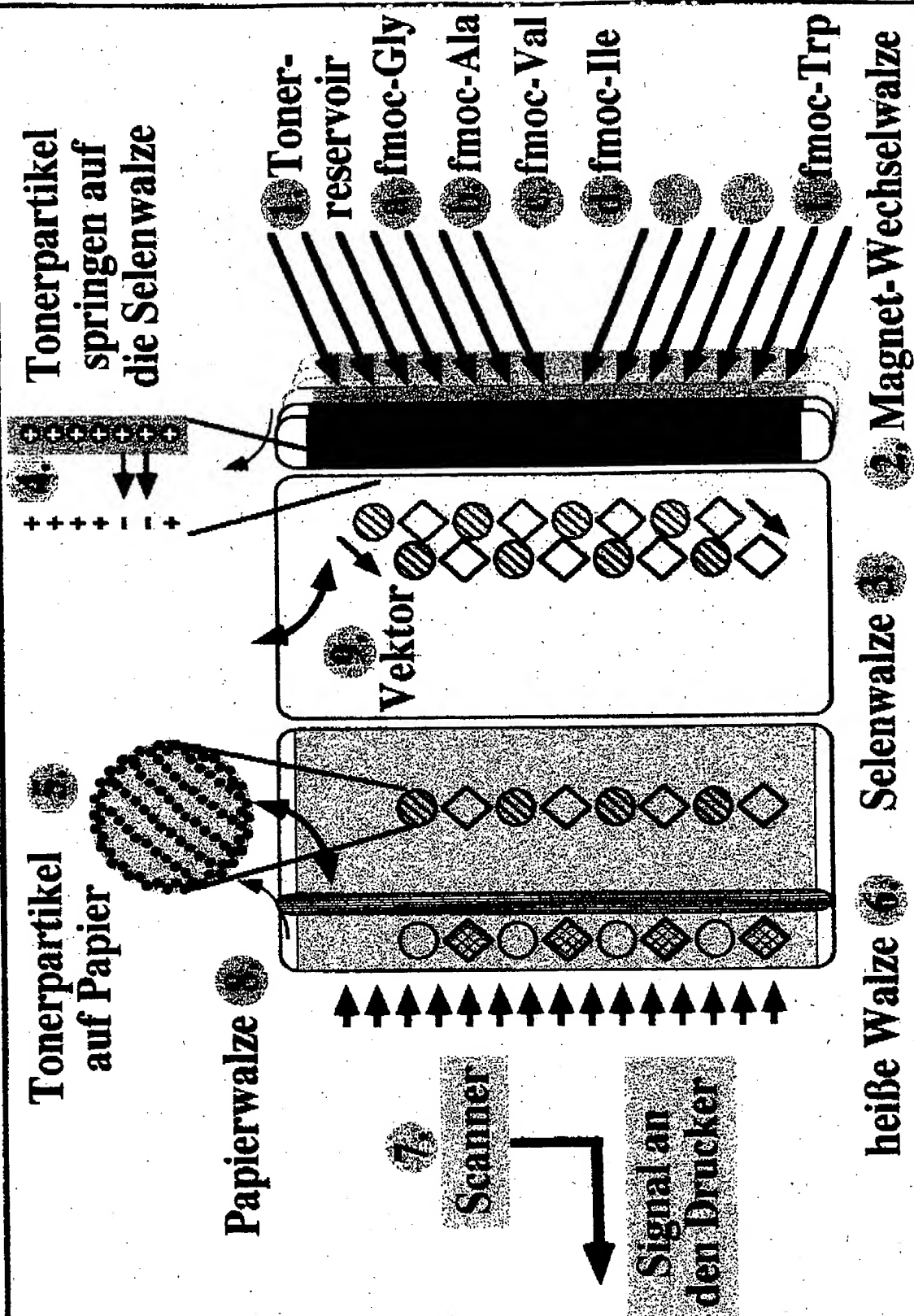


Abb. 16

Abb. 16

Die Anhydride von fmoc Aminosäuren geben bessere Kopplungseffizienzen

derivatisiertes Papier mit freien

Aminogruppen

+ fmoc-Aminosäure

+ Aktivator

+ Base

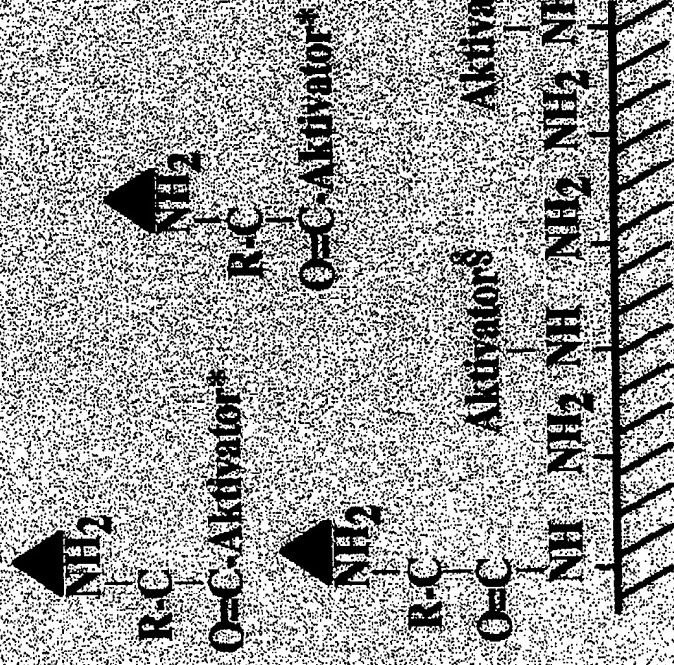
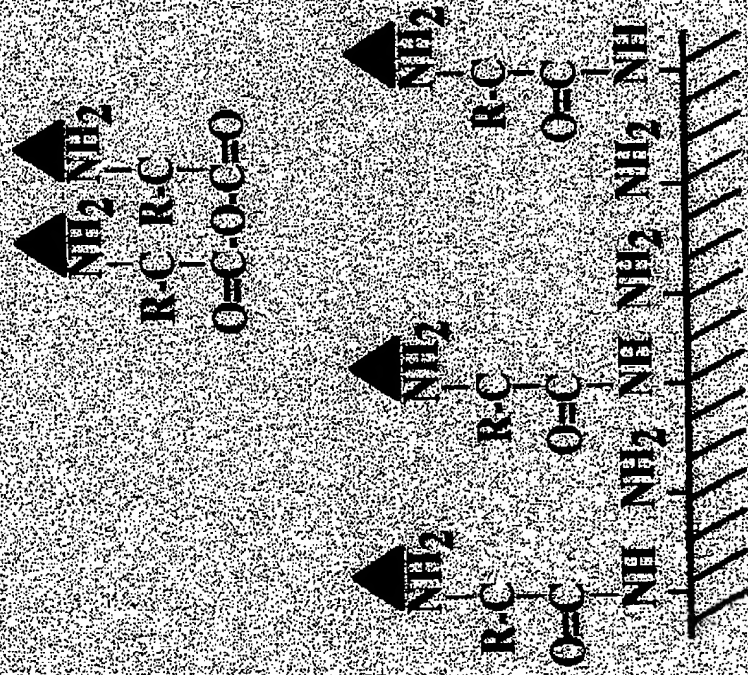


Abb. 18

derivatisiertes Papier mit freien

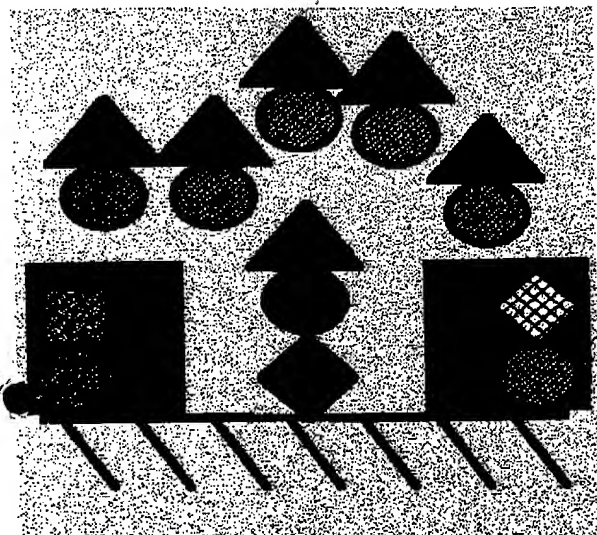
Aminogruppen

+ fmoc-Aminosäureanhydrid

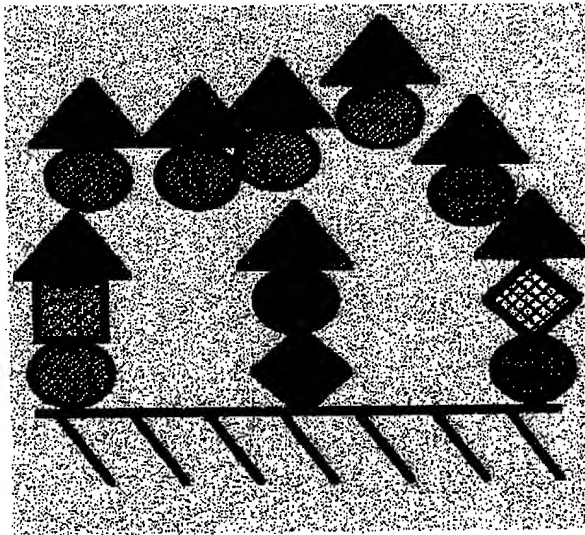


Lithographische Synthesemethoden

A Zugang zum
Syntheseort
durch Licht



B Abspalten der
Schutzgruppen
durch Licht



Vorteile:
konkurrenzlos hohe Auflösung

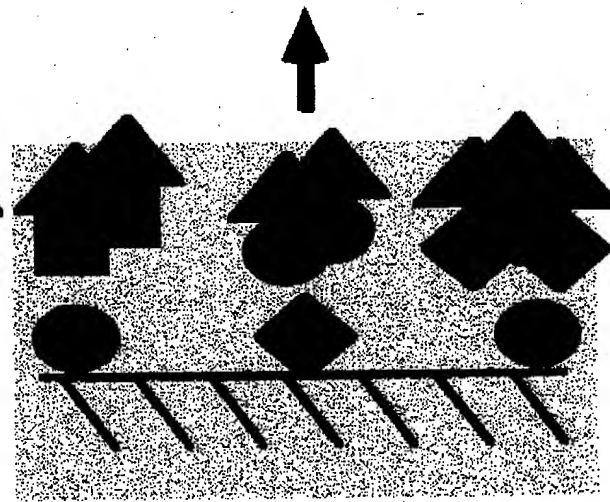
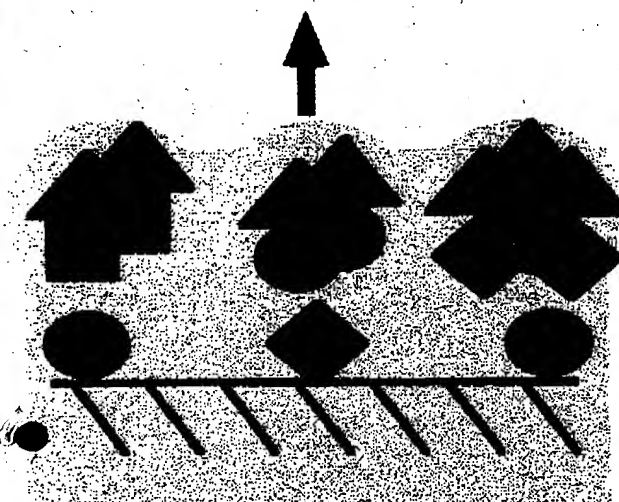
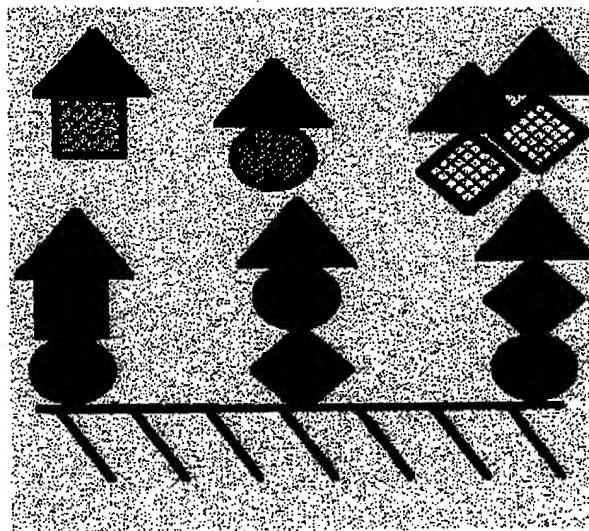
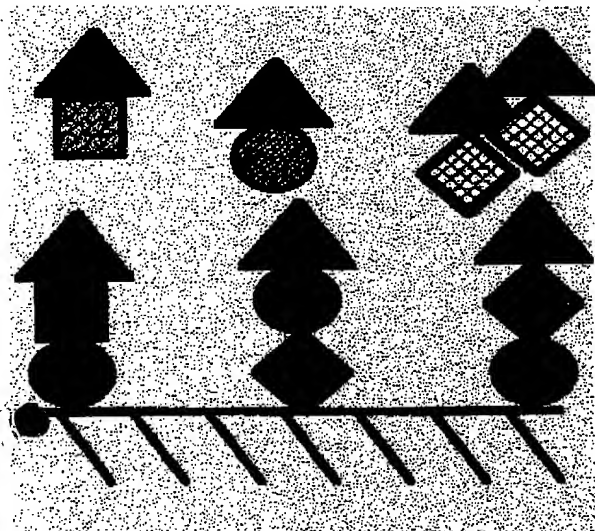
Nachteile:
bei jedem Layer müssen alle Monomere nacheinander
an den Träger gekoppelt werden

Abb. 19 A + 19 B

Kombinatorische Synthesemethoden

C Aufdrucken mit
einem
Laserdrucker

D Spotten oder
Tintenstrahl-
drucker



Vorteile:

paralleles Aufbringen aller Monomere

Nachteile:

verlaufen / verdunsten des Lösungsmittels

unerwünschte Diffusion der Monomere

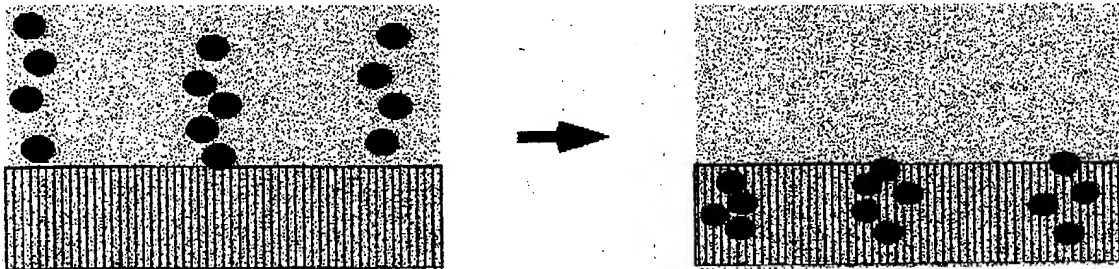
schlechte Auflösung

Abb. 19C + 19D

Fig. 19C + 19D

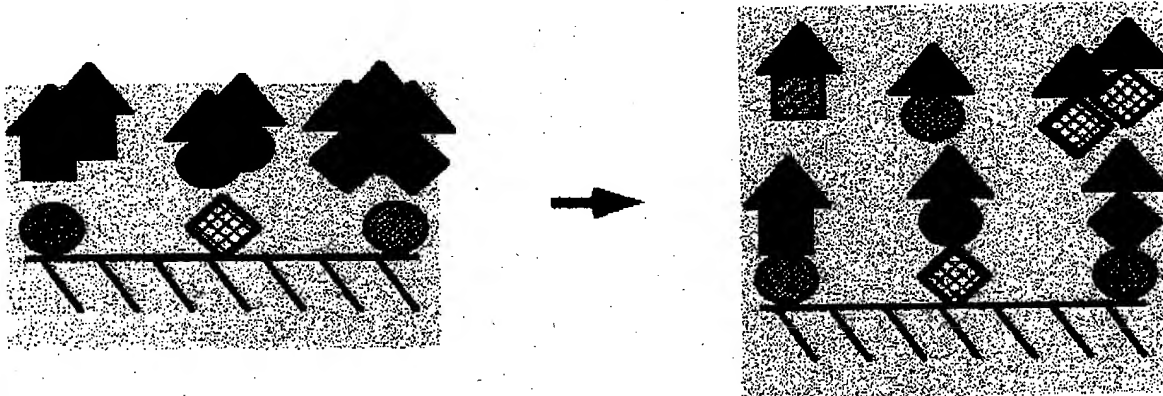
Nachteile des spottens von Monomeren

Anforderungen an das spotten von Farbe:



- niedrige Diffusionsrate der großen Chromophoren
- schnell verdunstendes Lösungsmittel
- saugfähiges Papier

Anforderungen an das spotten von Monomeren für die kombinatorische Synthese:



- hohe Diffusionsrate der kleinen Monomere
- sehr langsam verdunstendes Lösungsmittel
- Träger mit möglichst glatter Oberfläche

Abb. 20
Fig. 20

Nachteile der lithographischen Synthesen

1 X

N X

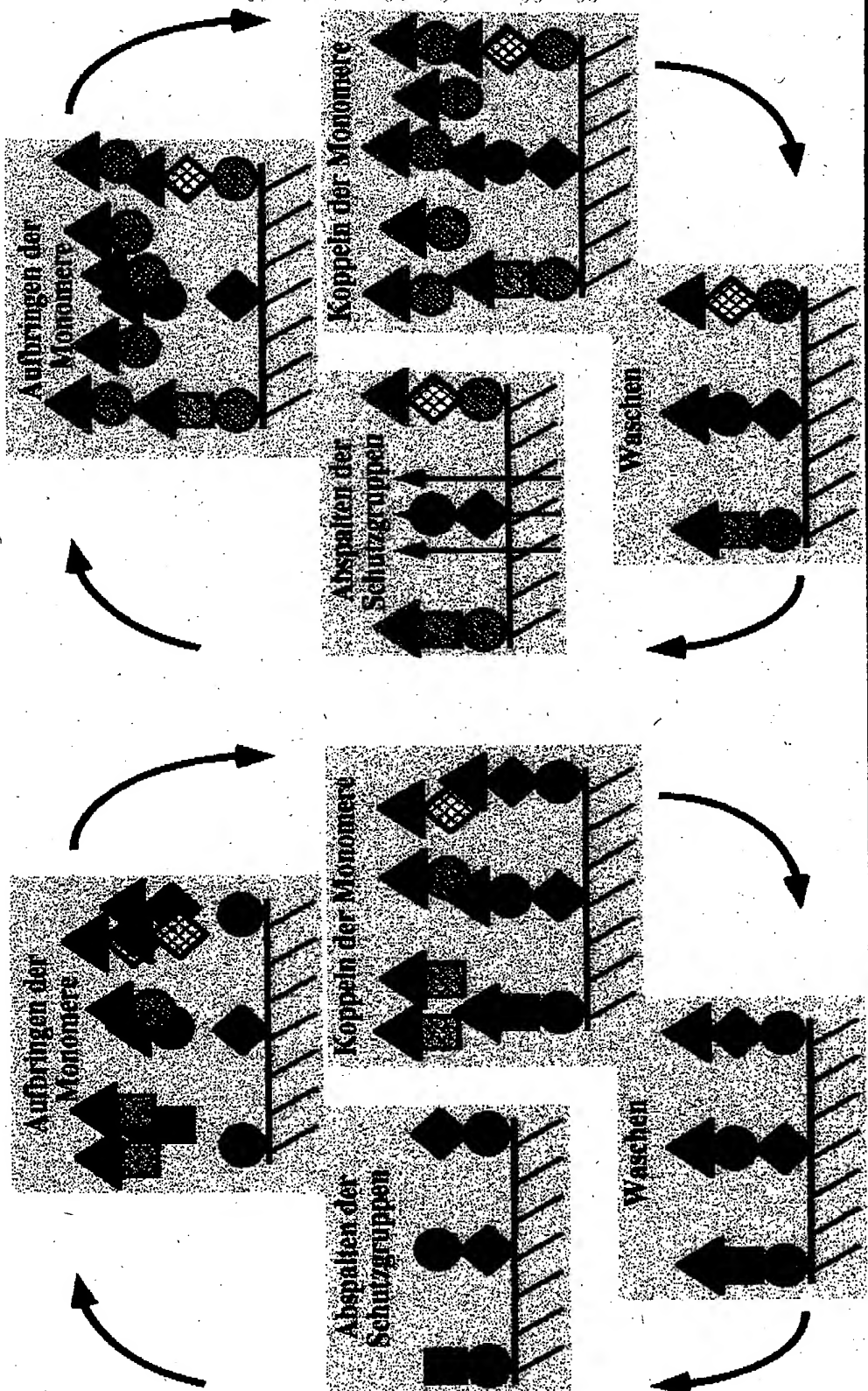
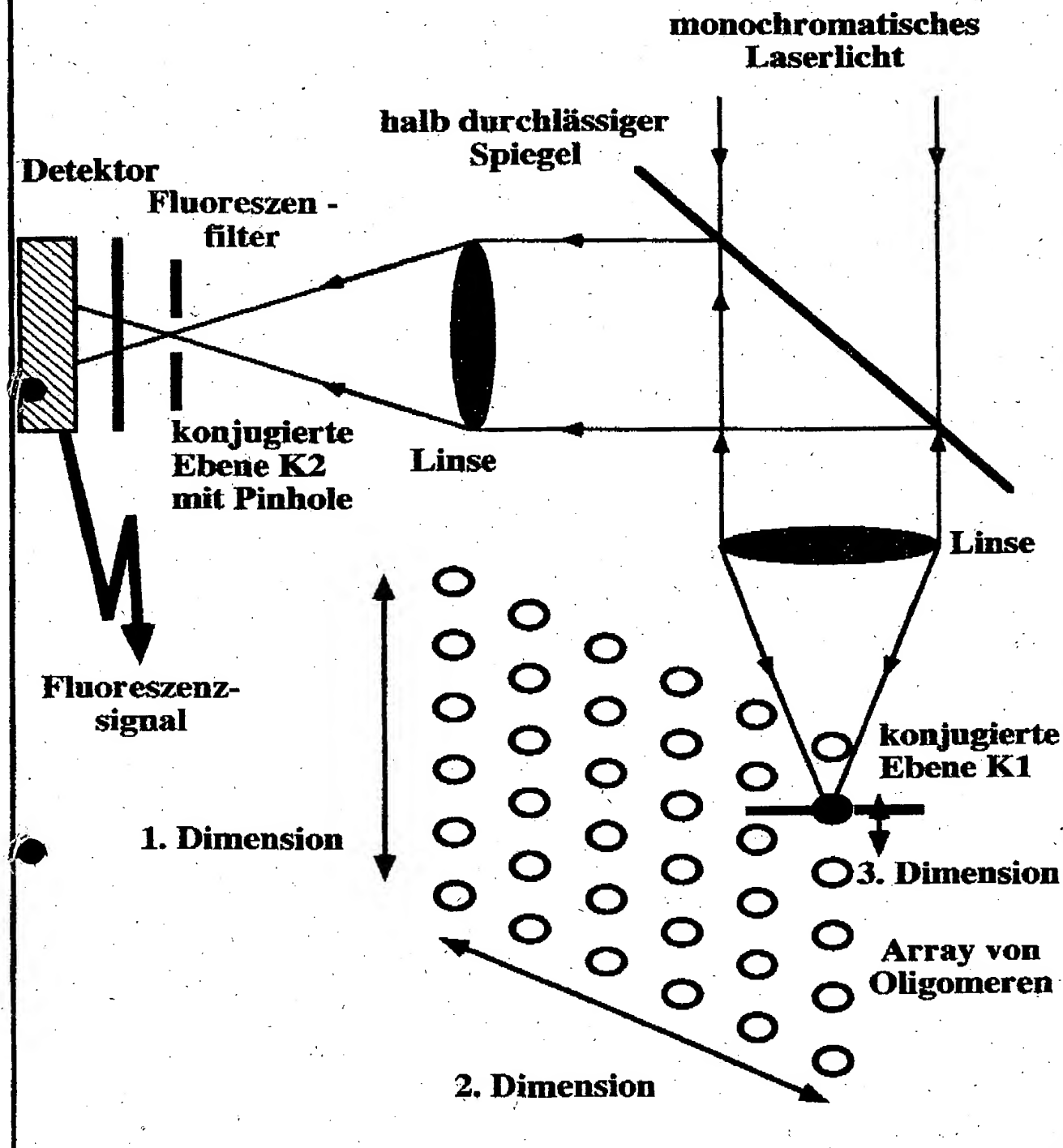


Abb. 21 Abb. 21

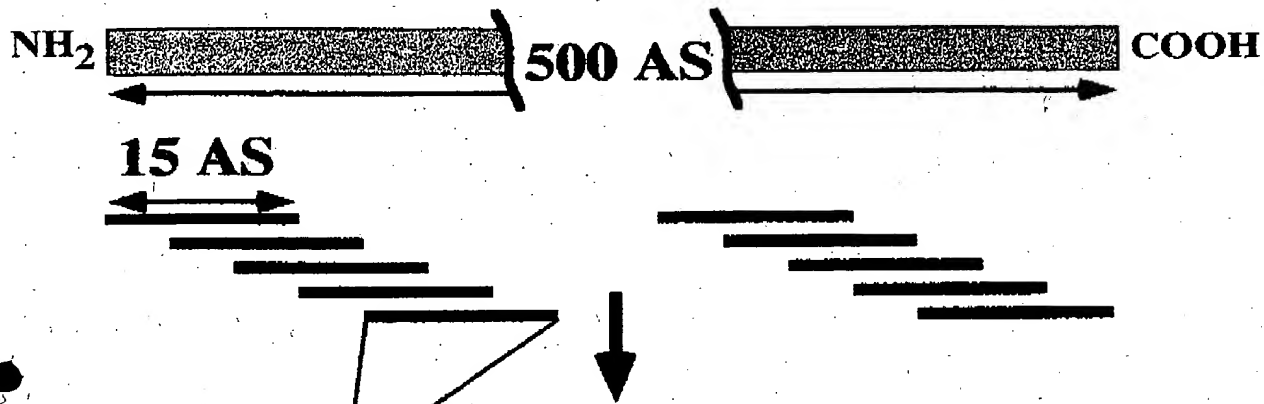
konfokaler Laser zum Auslesen der Fluoreszenzsignale



A6b.22
100.13

Array von Genprodukten

**ein durchschnittliches Gen des Menschen
codiert ca 500 Aminosäuren**



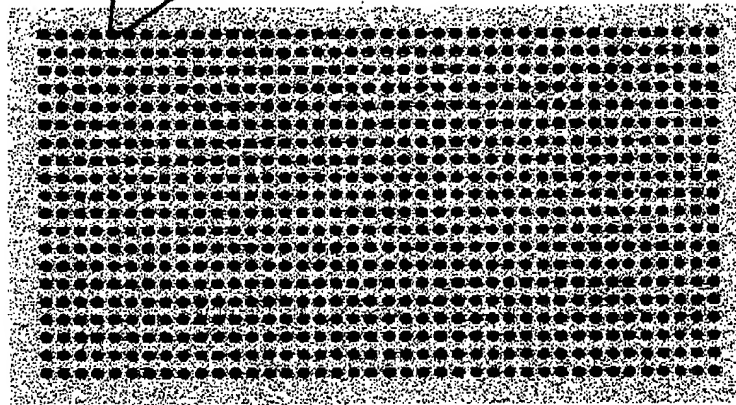
Gen 1

Gen 2

Gen 3

Gen 4

Gen 5



benötigte Peptide pro Gen (ca 500 AS):

= ca 100 x 15mere (je 5 AS versetzt)

Zahl der menschlichen Gene:

= ca 100.000

benötigte Peptide, um alle Gene abzudecken:

= 100 x 100.000 = ca 10 millionen

Abb. 23

F&E 93

Anwendungen für das Array von Genprodukten

1. Epitopbestimmung von monoklonalen Antikörpern
2. Serumprofil von Autoimmunpatienten
3. Serumprofil von Patienten mit Krankheiten unbekannter Ursache
4. Serumprofil von Krebspatienten
5. Suche nach Interaktionspartnern
 - a. von menschlichen Genprodukten
 - b. von Pathogenen (z.B. von viralen Genprodukten)

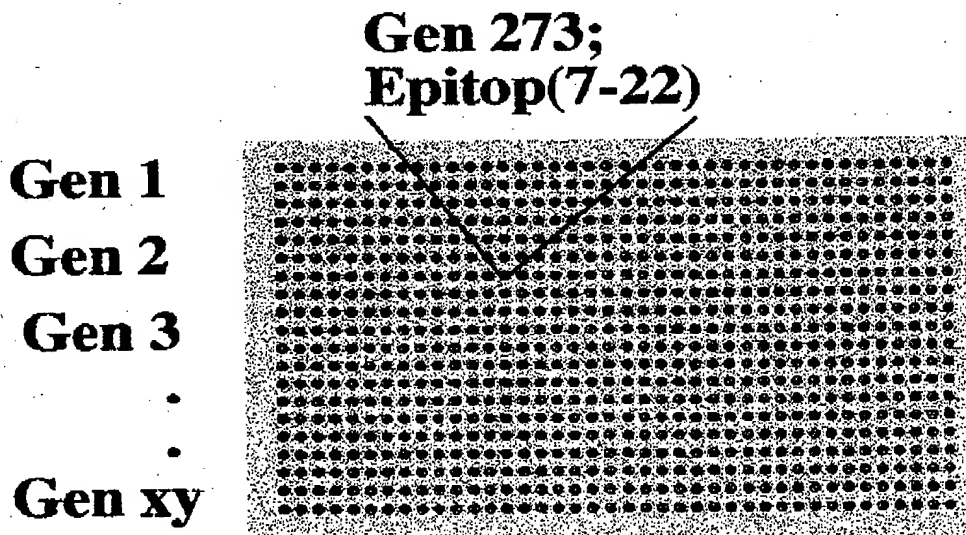


Abb. 23x
20x 23x

Vollständige Peptidbibliotheken

Synthese von Decamergemischen mit einzelnen festgelegten Aminosäurepositionen:

N = festgelegte Position

X = Gemisch von Aminosäuren



vollständige Tripeptidbibliothek:

= $20^3 = 8.000$ verschiedene Peptide



vollständige Tetrapeptidbibliothek:

= $20^4 = 160.000$ verschiedene Peptide



vollständige Pentapeptidbibliothek:

= $20^5 = 3,2$ millionen verschiedene Peptide



vollständige Hexapeptidbibliothek:

= $20^6 = 64$ millionen verschiedene Peptide

Abb. 24

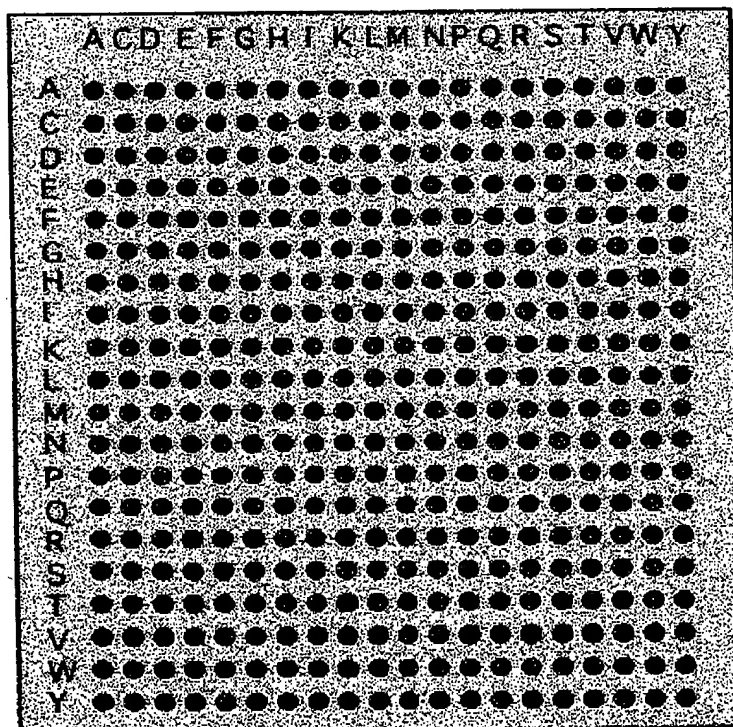
Fig. 24

Korrelation von Krankheit mit Peptidmuster

Färbung einer vollständigen Pentamerbibliothek mit Serum:

a. Kontrollseren

b. Patienten mit Magengeschwüren



Blaue Färbung:

Peptide, die von allen Seren erkannt werden

Rote Färbung:

Peptide, die nur vom Serum von Patienten mit Magengeschwüren erkannt werden

Abb. 25

Fig. 25

Anwendungen für das Array einer Penta oder Hexamerbibliothek

- 1. Epitopbestimmung von monoklonalen Antikörpern**
- 2. Auffinden von diagnostischen Markern durch Korrelation des Serumprofils mit der diagnostizierten Krankheit**
- 3. Serumprofil zur parallelen Diagnose von Krankheiten**
 - a. von Autoimmunkrankheiten**
 - b. von Infektionskrankheiten**
 - c. von Krebserkrankungen**
 - d. von Allergien**
 - e. von Krankheiten unbekannter Ursache**
- 4. Suche nach Interaktionspartnern**
 - a. von menschlichen Genprodukten**
 - b. von Pathogenen (z.B. von viralen Genprodukten)**

Epitop:
XXXAGNTSXXX

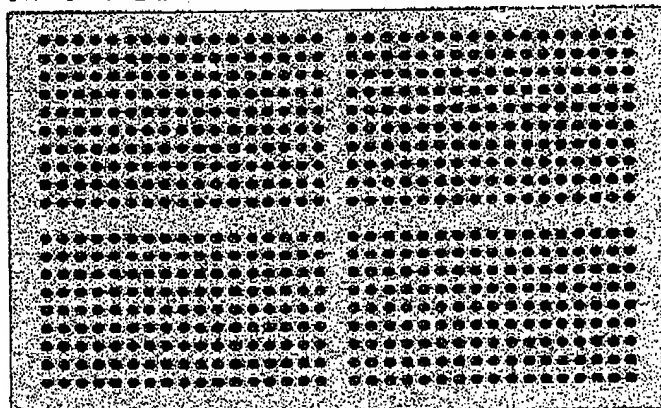


Abb. 25x

Mod. 25x

Suche nach Enzyminhibitoren

Die Bindung einer Protease an eine vollständige Pentamerbibliothek aus D-Aminosäuren:

Blaue Färbung:

**Peptide, an die die Protease binden kann
(nachgewiesen durch einen monoklonalen
Antikörper)**

Grüne Färbung:

**Enzymreaktion der gebundenen Protease mit
farbig markiertem Peptidsubstrat**

Rote Färbung:

gebundene Protease ohne Enzyaktivität

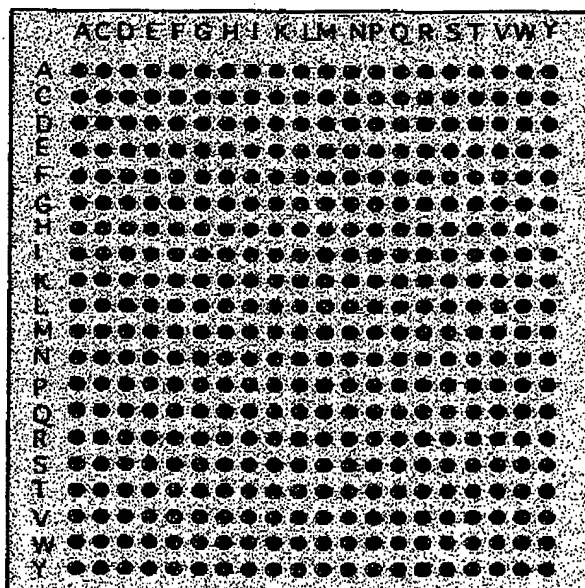
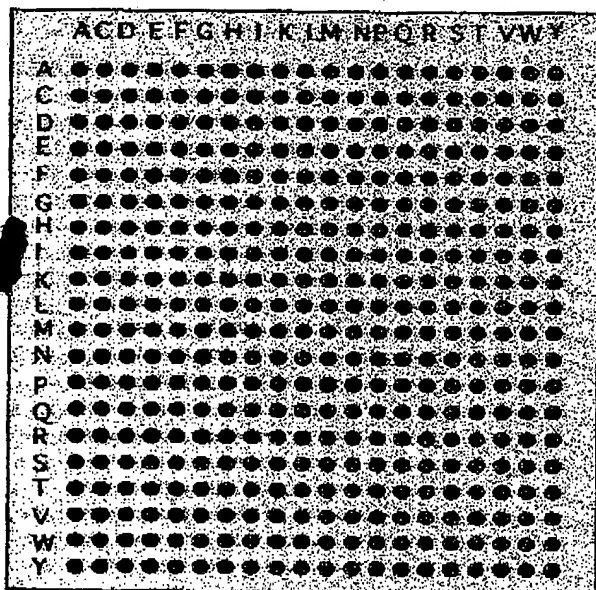


Abb. 26

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.